



UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
W KRAKOWIE

Wydział Farmaceutyczny

RECENZJA

rozprawy doktorskiej pt.:

**„Zastosowanie chromatografii cienkowarstwowej do analizy wybranych pigmentów
roślinnych”**

wykonanej przez mgr Elżę Łata

w Instytucie Chemii Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych

Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Ocena merytoryczna i metodologiczna rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Eweliny Łata, to bardzo cenne opracowanie, które udowadnia możliwość wykorzystania, zarówno klasycznych, jak i nowoczesnych technik chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w badaniach składu chemicznego i oceny jakości produktów spożywczych i/lub suplementów diety zawierających wybrane pigmenty roślinne i neolignany.

Obiektem badań chromatograficznych w ocenianej pracy były dwie grupy roślinnych barwników – antocyjany i betacyjany jako częste składniki produktów spożywczych oraz neolignany – honokiol i magnolol jako składniki suplementów diety. Część badań dotyczących neolignanów została wzbogacona o badania ich biologicznej aktywności metodą bioautografii z wykorzystaniem techniki HP-TLC, obejmujące aktywność antyoksydacyjną i przeciwbakteryjną.

Antocyjany i betalainy (w tym betacyjany), obok karotenoidów są naturalnymi barwnikami o silnych właściwościach antyoksydacyjnych. Również wymienione neolignany posiadają silny potencjał antyoksydacyjny. Wybór takiego obiektu badań w ramach ocenianej pracy uważam za bardzo istotny. Antyoksydanty, w tym szczególnie antyoksydanty pochodzenia naturalnego są od parunastu lat obiektem licznych badań fitochemicznych i farmakologicznych. Zainteresowanie świata nauki antyoksydantami wynika z ich cennych właściwości w leczeniu i zapobieganiu różnym chorobom cywilizacyjnym, takim jak, m.in. nadciśnienie, zawały, udary, otyłość, cukrzyca, czy choroby neurodegeneracyjne.

Zatem kontrola rzeczywistego składu produktów spożywczych o charakterze „health food” i/lub suplementów diety i ocena ich jakości, staje się niezwykle ważną problematyką naukowo-badawczą. Taki plan i całościowy zakres badań realizowany w ramach niniejszej pracy doktorskiej wpisuje się w ogólnoświatowe trendy badawcze i skierowany jest wyraźnie nie tylko na uzyskanie wyników o charakterze poznawczym, ale także wyraźnie na ich potencjalną aplikacyjność.

Lektura niniejszej rozprawy stała się prowokacją do przestudiowania monografii farmakopealnych dotyczących surowców antocyjanowych i neolignanowych.

Różne techniki chromatograficzne (w tym TLC, HPLC, GC) wykorzystywane są w celu potwierdzenia tożsamości oraz standaryzacji roślinnych surowców leczniczych. W najnowszym XII wydaniu Farmakopei Polskiej (FP), będącym tłumaczeniem 10 wydania European Pharmacopoeia figurują dwa surowce antocyjanowe – kwiat hibiskusa (*Hibisci sabdariffae flos*) i owoc borówki czernicy, świeży (*Myrtilli fructus recens*) oraz preparat galenowy – wyciąg suchy oczyszczony i standaryzowany ze świeżych owoców borówki czernicy (*Myrtilli fructus recentis extractum siccum raffinatum et normatum*).

Pierwszy z wymienionych surowców – kwiat hibiskusa standaryzowany jest jednak na zawartość kwasów organicznych (zawartość nie mniej niż 13,5% kwasów, w przeliczeniu na kwas cytrynowy). Z kolei potwierdzenie tożsamości z wykorzystaniem chromatografii cienkowarstwowej polega na porównaniu etanolowego roztworu badanego surowca z roztworem porównawczym, składającym się z metanolowego roztworu czerwieni chinaldynamowej i błękitu sulfonowego.

Z kolei owoc borówki czernicy, świeży, standaryzowany jest co prawda na zawartość antocyjanów (zawartość nie mniejsza niż 0,30% antocyjanów, w przeliczeniu na chlorek 3-O-glukozydu cyjanidyny (chryzanteminy)), ale w potwierdzeniu tożsamości metodą TLC, jako roztwór porównawczy przepisy FP polecają wykorzystanie metanolowego roztworu z suchego wyciągu z owoców borówki czernicy, a nie wzorcowych antocyjanów.

Wyciąg suchy oczyszczony i standaryzowany ze świeżych owoców borówki wg FP powinien zawierać od 32,4% do 39,6% antocyjanów, w przeliczeniu na chlorek 3-O-glukozydu cyjanidyny. W potwierdzaniu tożsamości metodą TLC roztworem porównawczym również nie są wzorcowe antocyjany, lecz metanolowy roztwór z suchego wyciągu z owoców. W potwierdzeniu tożsamości wyciągu przepisy FP nakazują także wykonanie rozdziału chromatograficznego metodą chromatografii cieczowej, ale również w tym badaniu roztworem porównawczym nie jest mieszanina wzorcowych antocyjanów.

Opisane metody potwierdzenia tożsamości surowców antocyjanowych wg FP wyraźnie wskazują na trudności analityczne dotyczące antocyjanów. Wynikają one głównie z niestabilności tej grupy barwników, m.in. ich degradacji pod wpływem światła, temperatury i pH. Zatem próby opracowania metodyki jakościowych rozdziałów i ilościowych oznaczeń tej grupy barwników podjęte w ramach ocenianej pracy doktorskiej uważam również z tych względów za bardzo ambitne i wartościowe.

W XII wydaniu FP nie figuruje żaden surowiec betacyjanowy, natomiast jako „nowe” surowce roślinne, wprowadzone zaledwie kilka lat temu do wykorzystania w oficjalnym leczeniu europejskim, w tym w polskim figurują dwa surowce, znane od dawna w tradycyjnej chińskiej medycynie (TCM), zawierające wymienione wcześniej neolignany – honokiol i magnolol – kora magnolii lekarskiej (*Magnoliae officinalis cortex*) ściągana z pni i gałęzi oraz kwiat magnolii lekarskiej (*Magnoliae officinalis flos*) - nierozwinięty kwiat poddany działaniu pary wodnej i wysuszony.

Standaryzacja obu surowców opiera się na określeniu sumy zawartości magnololu i honokiolu. W przypadku kory zawartość ta nie może być mniejsza niż 2,0% s.m., w przypadku kwiatów nie może być mniejsza niż 0,20% s.m. W ocenie zawartości obu lignanów należy wykorzystać chromatografię cieczową z wykorzystaniem metanolowych roztworów substancji wzorcowych. W potwierdzeniu tożsamości obu surowców przepisy FP nakazują również wykonanie rozdziałów chromatograficznych metodą TLC, stosując jako roztwór porównawczy wzorcowe neolignany i wzorzec eugenolu. Przepisy FP polecają rejestrację rozdziału chromatograficznego w obecności promieniowania UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) oraz po spryskaniu odczynnikiem wanilinowym i podgrzaniu w temperaturze 100-105°C i jego obserwację w świetle dziennym.

Ze względu na częstą obecność betacyjanów, najczęściej w formie soku z buraka w produktach spożywczych oraz jako deklarowany dodatek polepszający kolorystykę produktów spożywczych zawierających antocyjany, a także ze względu na częste ich zafałszowania podjęcie próby opracowania metodyki oznaczeń tej grupy barwników roślinnych uważam za bardzo istotne.

Również podjęcie próby opracowania prostej metodyki oceny jakości suplementów diety zawierających neolignany – magnolol i honokiol, zarówno z wykorzystaniem różnych technik TLC, jak i bioautografii uważam za bardzo trafne i niezwykle wartościowe.

Autorka pracy wskazuje na możliwość wykorzystania opracowywanej metodyki analitycznej w ocenie produktów spożywczych i/lub suplementów diety. Osobiście uważam, że opracowanie nowych metod rozdziału i oznaczeń ilościowych antocyjanów i badanych neolignanów można będzie zaproponować jako alternatywę dla niedoskonałej metodyki oznaczeń tych grup związków w leczniczych surowcach roślinnych proponowanej przez FP.

Stosowaną i/lub opracowaną przez Autorkę pracy metodykę badawczą wymienionych trzech grup związków i wyniki analiz przedstawiono poniżej.

Analiza antocyjanów

Analiza tej grupy barwników objęła 4 związki, dwa aglikony – chlorek pelargonidyny i chlorek delfinidyny oraz 2 połączenia glikozydowe – chlorek cyjaniny (chlorek 3,5-O-diglukozydu cyjanidyny) oraz chlorek keracyjaniny (chlorek 3-O-rutynozydu cyjanidyny). Analizy prowadzono klasyczną metodą TLC oraz metodą wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HP-TLC), opierając się na danych z piśmiennictwa naukowego. W tej części badań analizowano produkty spożywcze z wykorzystaniem substancji wzorcowych czterech wymienionych związków. Analizy TLC prowadzono na płytkach chromatograficznych pokrytych celulozą mikrokryształiczną w układzie rozwijającym - lodowaty kwas octowy: woda: n-butanol (16:19:65 v/v/v). W analizach metodą HP-TLC fazę stacjonarną stanowił żel krzemionkowy 60 F₂₅₄, a fazę ruchomą mieszanina octanu etylu, 2-butanonu, kwasu mrówkowego i wody (7:3:1,2:8 v/v/v/v).

Analizą objęto aż 18 produktów spożywczych, których składnikami były kolejno: owoce czarnej porzeczki (5 produktów), owoce aronii (4 produkty), owoce maliny (3 produkty), owoce czarnego bzu (2 produkty) oraz pojedyncze produkty bazujące na winogronach, borówkach, śliwkach i wiśniach. Analizowano soki, soki domowej produkcji, syropy, nektar i napoje niegazowane bazujące na wymienionych owocach, a także szusz roślinny z którego przygotowano napar.

Z porównania testowanych metod chromatograficznych (klasyczna TLC i HP-TLC) wynikało, że dla oznaczania antocyjanów w próbkach produktów spożywczych bardziej przydatna jest klasyczna metoda TLC. Metoda pozwala na oznaczenie wszystkich czterech badanych związków. Po zastosowaniu metody HP-TLC pojawiają się problemy z oznaczaniem delfinidyny (już na etapie krzywych wzorcowych) oraz w niektórych próbach z oznaczaniem cyjaniny i keracyjaniny.

W żadnym z analizowanych 18 produktów nie potwierdzono obecności pelargonidyny. W trzech produktach nie stwierdzono obecności antocyjanów ani metodą TLC, ani HP-TLC, co mogło być spowodowane rozkładem barwników pod wpływem światła, czy temperatury.

Drugim etapem badań dotyczącym antocyjanów było autorskie opracowanie warunków analizy dla 3-krotnego rozwinięcia chromatogramów metodą TLC w celu oceny stabilności antocyjanów oraz możliwości ich jakościowych i ilościowych oznaczeń. W tej części badań fazą stacjonarną był żel krzemionkowy (RP-18 F₂₅₄), a fazami ruchomymi kolejno: acetonitryl: metanol: lodowaty kwas octowy (16:4:0,15 v/v/v), metanol: lodowaty kwas octowy (20:0,15 v/v) i metanol: lodowaty kwas octowy w innych proporcjach (20:0,45 v/v).

Przed zasadniczym badaniem degradacji antocyjanów (głównie glikozydowych połączeń) metodą TLC-MS, przeprowadzono wstępną ocenę stabilności substancji wzorcowych. Ocenę prowadzono przez okres 3 tygodni. W punkcie „0” po rozwinięciu płytki zastosowano wielokrotne skanowanie densytometryczne (zmiana długości fali co 5 nm), które pozwoliło na wyznaczenie maksimów absorpcji dla badanych związków. W trakcie 3 tygodni obserwowano szybką utratę barwy roztworu delfinidyny. Pozostałe roztwory substancji wzorcowych były zdecydowanie bardziej stabilne. Wszystkie roztwory zdecydowano przechowywać w temperaturze - 20°C.

W badaniach degradacji glikozydowych połączeń antocyjanów, o której świadczyły dodatkowe pasma na chromatogramach, widoczne pod UV ($\lambda = 366$ nm) w rozdzielach metodą TLC i HP-TLC wykorzystano analizy metodą spektrometrii mas, otrzymując widma masowe dla poszczególnych pasm. Świadczyły one o dekompozycji glikozydów, m.in. do aglikonów i glikonów (cząsteczek glukozy i rutynozy).

W celu przeprowadzenia analiz ilościowych wyznaczono krzywe kalibracyjne metodą TLC i HP-TLC, nanosząc roztwory wzorców w ilościach od 1 do 6 μ l. Otrzymane chromatogramy skanowano densytometrycznie. Dla 3 analizowanych związków – cyjaniny, keracyjaniny i pelargonidyny, zarówno w przypadku metody TLC, jak i HP-TLC najlepsze intensywności rozwiniętych pasm otrzymano przy $\lambda = 540$ nm w trybie absorpcji, dla delfinidyny przy $\lambda = 350$ nm w trybie fluorescencji tylko w przypadku metody TLC.

W ramach badań tej grupy barwników przeprowadzono również badania dekompozycji glikozydowych połączeń z wykorzystaniem odczynnika PABA (kwas p-aminobenzoowy). Bazowano na reakcji nieenzymatycznego brunatnienia cukrów, tzw. reakcję Moillarda, pozwalającej na wykrycie obecności węglowodanów. Płytki po 3-krotnym rozwinięciu i spryskaniu ogrzewano w temperaturze 140°C (5 minut), a następnie chłodzono i skanowano densytometrycznie w trybie fluorescencyjnym przy $\lambda = 420$ nm (wykorzystano lampę rtęciową). Otrzymane obrazy sugerowały, że części cukrowe zostały odcięte już po pierwszym rozdziale chromatograficznym.

Wstępnym etapem w analizie ilościowej produktów spożywczych metodą 3-krotnego rozwinięcia było sporządzenie krzywych kalibracyjnych dla oznaczanych 4 związków. Wykonano liniowe wykresy zależności między ilością μ l 3 wzorców, a powierzchnią pod odpowiednimi sygnałami zmierzonymi densytometrycznie. Dla keracyjaniny sporządzono wykresy zależne od wysokości otrzymanych pików na densytogramach. W analizie aglikonów przeprowadzono pojedyncze rozdziały chromatograficzne z wykorzystaniem fazy ruchomej I. Wszystkie chromatogramy skanowano densytometrycznie w trybie absorpcji (lampa wolframowa). Pasma dla cyjaniny i keracyjaniny analizowano przy $\lambda = 545$ nm, pasma dla pelargonidyny i delfinidyny, odpowiednio przy $\lambda = 450$ nm i 555 nm.

Oprócz równań krzywych kalibracyjnych wyznaczano wartości współczynników determinacji, granic wykrywalności (LAD) i oznaczalności (LOQ). Analizie 3-krotnego rozdziału poddano 7 różnych produktów spożywczych, których producenci deklarowali je jako stuprocentowo naturalne; były to soki z czarnej porzeczki, aronii, czarnego bzu, jagody (czy chodziło o borówkę czarną?!), syropy z jeżyny, płatków róży i napar z hibiskusa.

Identyfikacja i oznaczenia ilościowe antocyjanów w produktach spożywczych były trudne, głównie z powodu hydrolizy glikozydowych połączeń.

Podsumowując, w ramach przeprowadzonych jakościowych i ilościowych analiz antocyjanów w produktach spożywczych metodami TLC i HP-TLC, lepszą metodą okazała się klasyczna metoda TLC. Umożliwiała ona oznaczenia 4 badanych związków.

Opracowano autorską metodę 3-krotnego rozwinięcia do oznaczania jakościowego i ilościowego antocyjanów, którą można wykorzystać w badaniach składu produktów spożywczych.

Badania wykazały niestabilność oznaczanych związków, szczególnie ich glikozydowych połączeń. Z wykorzystaniem spektrometrii mas udowodniono częściową hydrolizę glikozydów już w trakcie rozdzielania chromatograficznego. Stwierdzono ponadto rozkład antocyjanów przejawiający się ich stopniową utratą barwy, także w przypadku aglikonów.

Analiza betacyjanin

Analiza tej grupy barwników objęła jeden związek dostępny na rynku, o niskim stopniu czystości – betaninę. Związek ten potraktowano jako substancję referencyjną i wzorzec do badań w ramach analiz jakościowych. Ponadto sporządzono świeży sok z buraka.

Celem badań było opracowanie metody TLC pozwalającej na wykrywanie betacyjanin oraz zastosowanie jej do badania składu produktów spożywczych, w tym zafałszowań betacyjaninami.

Analizą objęto soki z: czarnej porzeczki, aronii, jeżyny, borówki amerykańskiej oraz sok z bzu czarnego, zakupione w lokalnych sklepach i/lub aptekach, producenci których deklarowali brak dodatkowych składników.

Pierwszym krokiem w prowadzonych badaniach było określenie stabilności barwników buraczanych w świeżo sporządzonym soku metodą spektrofotometryczną w zakresie długości fal UV-Vis (200-800 nm). Widma charakteryzowały się dwoma maksimumami absorbancji przy $\lambda = 490$ nm i $\lambda = 540$ nm i były prawie identyczne przed okres 5 kolejnych dni. Było to bardzo istotne uzasadnienie prowadzenia badań na świeżym soku z buraka, maksymalnie przez 5 dni. Kolejnym krokiem było opracowanie warunków analiz betacyjanin metodą TLC. Analizy prowadzono z użyciem żelu krzemionkowego (RP-18 F₂₅₄), jako fazy stacjonarnej i czteroskładnikowej fazy ruchomej (acetonitryl: metanol: woda: lodowaty kwas octowy (2:7:1:0,1 v/v/v/v)).

Pierwsze analizy objęły sok z buraka i betaninę. W zastosowanym układzie chromatograficznym uzyskano bardzo charakterystyczny, nietypowy rozdział w płaszczyźnie poziomej na dwa pasma o tej samej wartości współczynnika R_F , oddzielone od siebie w płaszczyźnie poziomej o ok. 6 mm, o skośnym ułożeniu. Poziomą migrację związków powiązano z procesem dyfuzji.

Otrzymane chromatogramy wizualizowano densytometrycznie przy $\lambda = 550$ nm w trybie absorbancji. Ponadto dla rozdzielonych pasm lewych i prawych (zarówno z soku buraka, jak i betaniny) otrzymano widma UV-Vis zarejestrowane densytometrycznie bezpośrednio z płytki chromatograficznej w zakresie długości fal 200-700 nm (widma „in situ”). Na otrzymanych widmach maksimum absorpcji lewych i prawych pasm występują przy $\lambda = 545$ nm, są przesunięte o 5 nm w stosunku do widm uzyskanych metodą spektrofotometryczną.

Kolejnym etapem badań były analizy betacyjanin metodą TLC-MS zarówno w soku z buraka, jak i roztworu betaniny. W przypadku soku z buraka w uzyskanych widmach dominowały dwa sygnały, przy $m/z = 321$ i 523 , w przypadku betaniny trzy sygnały, przy $m/z = 305$, 361 i 523 .

Sygnał przy $m/z = 523$ pochodził od glikozydu betaniny lub izobetaniny. Wartość sygnału wskazywała jednak na odłączenie się jednej grupy – CO i jednoczesne przyłączenie kationu H^+ . Był to jedyny sygnał, który występował w obu analizowanych próbkach. Widma pasm lewych i prawych w każdej próbce były prawie identyczne.

Opracowaną metodykę zastosowano do wykrywania obecności betacyjanin w produktach spożywczych – w wymienionych powyżej sokach. Jedynie w soku z bzu czarnego stwierdzono obecność betacyjanin. Rozdział próbki na 2 pasma – „lewe” i „prawe” były podobne do rozdzielonych uzyskanych dla soku z buraka i roztworu betaniny. Otrzymane chromatogramy zeskanowano densytometrycznie. Ponadto wykonano widma „in situ” w zakresie długości fal 200-700 nm dla lewego i prawego pasma. Były one bardzo zbliżone do widm otrzymanych dla roztworu betaniny. Otrzymane widma pomimo przesunięcia maksimum absorbancji ($\lambda = 545$

na $\lambda = 531 \text{ nm}$) mogą potwierdzać obecność betaniny w soku z bzu czarnego. Analiza pasm metodą TLC-MS udowodniła podobieństwo sygnałów dla próbek soku i roztworu betaniny. Był to kolejny dowód wzbogacenia soku w betacyjany.

Podsumowując, Autorka opracowała warunki rozdzielania betacyjanin metodą TLC. Uzyskała bardzo charakterystyczny poprzeczny rozdział pasm, który można zaproponować do jakościowych oznaczeń betacyjanin w produktach spożywczych, jako tzw. „fingerprint”. Ponadto metodą spektrofotometryczną UV-Vis Autorka udowodniła stabilność betacyjanin w soku z buraka utrzymującą się przez okres 5 dni, co stanowi praktyczną wskazówkę dotyczącą okresu czasu, w którym można prowadzić analizy tej grupy barwników.

Analiza neolignanów

Analiza tej grupy związków objęła dwa związki izomeryczne – magnolol i honokiol. Związki te są składnikami suplementów diety ważnych w łagodzeniu stanów lękowych i wahaniach nastroju. Celem badań było opracowanie metody rozdzielania i ilościowych oznaczeń tych związków metodą TLC, w celu możliwości kontroli jakości suplementów diety.

Badania objęły także opracowanie metody HP-TLC sprzężonej z badaniami mikrobiologicznymi, z wykorzystaniem bakterii G(-) *Aliivibrio fischeri* i bakterii G(+) *Bacillus subtilis*. Badania w tym obszarze były możliwe dzięki współpracy z Instytutem Ochrony Roślin z Budapesztu. Wykonano także badania aktywności antyoksydacyjnej z wykorzystaniem rodnika DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazyl).

Rozdziały obu związków były prowadzone na żelu krzemionkowym 60 F₂₅₄, fazę ruchomą stanowiła mieszanina n-heksanu, octanu etylu i etanolu (16:3:1 v/v/v). Przed rozpoczęciem oznaczeń ilościowych obu lignanów oceniono ich stabilność metodą HP-TLC-MS. Chromatogramy rozwijano w dwóch kierunkach. Drugie rozwinięcie (po 20 godz.) wykazało rozkład badanych związków. Oprócz sygnałów przy $m/z = 265$ (masy molowe związków) charakterystyczna była obecność sygnałów przy $m/z = 529$ (masy molowe dimerów obu związków!). Badania stabilności pozwoliły na podjęcie decyzji dotyczącej czasu przeprowadzania analiz łącznie z densytometrią skaningową do 4 godz. od rozwinięcia chromatogramu.

W kolejnym etapie badań wyznaczono krzywe kalibracyjne metodą TLC zakres ich liniowości, współczynniki determinacji R^2 , granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ). Roztwory wzorcowe nanoszono w ilościach od 1 μl do 6 μl . Krzywe pozwoliły na ilościowe oznaczenia obu związków w suplementach diety.

Analizą objęto 6 różnych suplementów diety zakupionych w polskich i/lub węgierskich sklepach internetowych i aptekach. Suplementy miały formę tabletek, kapsułek i płynu. Ponadto analizą objęto dwa preparaty zawierające badane neolignany w nieznanymi proporcjach, będące surowcami handlowymi do przygotowywania suplementów diety. Wszystkie próbki suplementów diety poddawano 3-krotnej ekstrakcji metanolem, przeprowadzając analizę TLC po każdej z nich i każdorazowo obliczając zawartość obu neolignanów.

W kolejnym etapie wyznaczono także precyzję opracowanej metody ocenionej na podstawie względnego odchylenia standardowego dla zawartości magnololu i honokiolu. Uzyskano satysfakcjonujące wyniki – precyzję odpowiednio równą 2,23% i 2,35% dla badanych związków.

W oznaczeniach zawartości neolignanów metodą TLC po przeprowadzonej 3-krotnej ekstrakcji i oznaczeniu po każdej ekstrakcji zawartości obu związków wyniki porównywano z tymi deklarowanymi przez producenta. Analizy surowców handlowych udowodniły w nich ilościową dominację jednego z lignanów (odpowiednio 91,1% i 63,3%).

Rozdziały prowadzono metodą TLC i HP-TLC, skanowano densytometrycznie i rejestrowano widma UV-Vis.

Oryginalną, interesującą częścią badań były też badania bioautograficzne magnololu i honokiolu z wykorzystaniem metody HP-TLC-EDA (Effect-Directed Analysis) ukierunkowane na badania właściwości przeciwbakteryjnych i właściwości antyoksydacyjnych. W badaniach wykorzystano bioautografię bezpośrednią. Rozdziały prowadzono na płytkach pokrytych żelazem krzemionkowym F₂₅₄ w opracowanym wcześniej trójskładnikowym układzie rozwijającym – n-heksan: octan etylu: etanol (16:3:1 v/v/v). Analiza chromatograficzna objęła również analizę densytometryczną otrzymanych pasm. Densytogramy rejestrowano przy $\lambda = 254 \text{ nm}$ i $\lambda = 290 \text{ nm}$ w trybie absorbancji.

W celu oceny właściwości antybakteryjnych wysuszone chromatogramy zanurzano w zawiesinach bakteryjnych. W przypadku szczepu *A. fischeri* o aktywności przeciwbakteryjnej świadczyło zaciemnienie pasm na bioautogramach luminescencyjnych.

W przypadku szczepu *B. subtilis* procedura była bardziej skomplikowana. Po 2 godzinach inkubacji płytek chromatograficznych w wodnym roztworze barwnika MTT (błękit tiazolilowy), w stężeniu 1 mg/ml, w temperaturze 28°C, o aktywności przeciwbakteryjnej neolignanów świadczyły jasne plamy na niebieskim tle.

W celu oceny właściwości antyoksydacyjnych płytki chromatograficzne zanurzano w roztworze DPPH (0,02% roztwór metanolowy). O właściwościach antyoksydacyjnych świadczyły odbarwienia fioletowego odczynnika.

Badane suplementy diety, w których potwierdzono obecność neolignanów wykazały właściwości przeciwbakteryjne przeciwko obu testowanym szczepom bakterii. W przypadku szczepu *A. fischeri* właściwości przeciwbakteryjne wykazywały nie tylko neolignany, ale także inne składniki suplementów – m.in. piperyna. W przypadku szczepu *B. subtilis* za działanie przeciwbakteryjne były odpowiedzialne tylko neolignany.

Badania z roztworem DPPH udowodniły właściwości antyoksydacyjne neolignanów w badanych suplementach diety. W próbkach, w których nie wykryto neolignanów nie potwierdzono właściwości antyoksydacyjnych.

Podsumowując, w tej części badań opracowano metodę rozdziału chromatograficznego magnololu i honokiolu metodą TLC. Wykorzystano ją do analiz jakościowych i ilościowych badanych neolignanów w suplementach diety. Opracowana metoda charakteryzuje się satysfakcjonującą precyzją pomiarów.

Badania bioautograficzne udokumentowały właściwości antyoksydacyjne obu badanych neolignanów, a także ich właściwości przeciwbakteryjne. Zarówno właściwości antyoksydacyjne, jak i przeciwbakteryjne udowodniono także dla tych suplementów diety, które zawierały neolignany.

Metodyka zastosowana i/lub opracowana przez Autorkę zarówno w fitochemicznej części pracy (TLC, HP-TLC, TLC-MS, HP-TLC-MS), jak i w badaniach aktywności biologicznej (HP-TLC-EDA) nie budzi żadnych zastrzeżeń. Autorka proponuje wykorzystanie w analizach badanych związków zarówno klasyczne, jak i nowoczesne techniki chromatografii cienkowarstwowej.

Realizacja pracy wymagała przeprowadzenia licznych, bardzo żmudnych eksperymentów. Była dużym wyzwaniem, głównie z powodu niestabilności oznaczanych barwników, w tym szczególnie tych z grupy antocyjanów.

Autorce udało się uzyskać zadowalające wyniki, które w znacznym stopniu są nowatorskie i posiadają potencjalnie aplikacyjny charakter. Wyniki pracy promują przydatność stosunkowo prostych i szybkich w zastosowaniu oraz stosunkowo tanich metod chromatograficznych w identyfikacji składu chemicznego i standaryzacji produktów spożywczych i/lub suplementów diety.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska posiada klasyczną formę, mimo, że wyniki pracy zostały opublikowane w formie czterech, oryginalnych publikacji. Autorka przedstawia w pracy rozwiązywaną problematykę naukowo-badawczą, charakteryzuje grupy związków objętych analizą, prezentuje cele, metodykę, uzyskane wyniki i wnioski.

Sądzę, że ze względu na specyfikę prowadzonych badań i wynikającą z niej konieczność szczegółowego przedstawienia warunków i wyników prowadzonych rozdziałów chromatograficznych, był to jedyny słuszny wybór. Pożądane byłoby jednak umieszczenie wspomnianych 4 publikacji w rozprawie.

Część teoretyczna pracy określona jako „Część literaturowa” (54 strony), poprzedzona wykazem skrótów i oznaczeń (1 strona) przedstawia umiejętnie wyselekcjonowane istotne informacje dotyczące charakterystyki roślinnych metabolitów pierwotnych i wtórnych, a następnie charakterystyki fizyczno-chemicznej, znaczenia w życiu roślin i walorów prozdrowotnych badanych związków - antocyjanów, betalain, lignanów i neolignanów. Czyta się ją z przyjemnością, napisana jest bardzo klarownie.

Część eksperymentalna (określona jako „Część badawcza” – 60 stron) przedstawia zastosowaną metodykę i wyniki analiz chromatograficznych z klarownym podziałem na analizy antocyjanów, betacyjanów i neolignanów. „Omówienie wyników” prezentuje się bardzo atrakcyjnie, dzięki licznym elementom graficznym. Są to rysunki w liczbie 36 i 24 tabele. Rysunki obejmują struktury związków, liczne chromatogramy, densytogramy, widma UV-Vis, widma masowe.

Część eksperymentalną kończą rzeczowe (1,5 strony) wnioski, które tak naprawdę są podsumowaniem wyników oraz prezentacja „Osiągnięć naukowych” – wykaz czterech publikacji tematycznie związanych z rozprawą doktorską, ponadto wykaz pozostałych publikacji naukowych (7 pozycji) i publikacji konferencyjnych z podziałem na postery (7 pozycji) i wystąpienia ustne (3 pozycje) oraz inne materiały konferencyjne (2 pozycje). Szkoda, że wśród publikacji konferencyjnych Autorka nie wyróżniła tych związanych z realizacją pracy doktorskiej.

Piśmiennictwo (określone jako „Literatura”), poprzedzone „Spisem rysunków” i „Spisem tabel” obejmuje 128 pozycji nawiązujących tematycznie do różnych aspektów poruszanych w pracy. Jest to piśmiennictwo z ostatnich lat, właściwie dobrane i trafnie cytowane.

Całość tekstu rozprawy obejmuje łącznie z piśmiennictwem 138 stron.

Znaczna objętość tekstu powoduje zwykle pojawienie się błędów stylistycznych i typu edytorskiego; taką sytuację mamy również w ocenianej pracy. Błędów tych zdecydowałam się nie wymieniać. Zwrócę jednak uwagę na wybrane przykłady błędów nomenklaturowych i drobnych błędów merytorycznych, które wkradły się w tekst:

- glicerol przemiennie nazywany jest gliceryną;
- kwasy solne przemiennie nazywany jest kwasem chlorowodorowym;
- rutozyd przemiennie nazywany jest rutyną;
- galaktany błędnie nazwane są galaktazami;
- białka o strukturze I, II i III-rzędowej określano jako białka I, II i III-rzędowe
- keracyjanina przemiennie nazywana jest kracyjaniną.

Inne uwagi dotyczące niedoskonałości pracy ograniczają się tylko do:

- braku w tytule rozprawy członu nawiązującego do analizowanych neolignanów;
- braku streszczenia pracy w j. polskim i w j. angielskim;
- braku wniosków wynikających z przeprowadzonych badań; część pracy zatytułowana „Wnioski”, to jak wspomniano powyżej podsumowanie wyników;
- umieszczenia w pracy tabel, w których figurują pojedyncze dane;
- używanie nie do końca poprawnej nomenklatury botanicznej: bez czarny, to botanicznie poprawnie dziki bez czarny, borówka to botanicznie poprawnie borówka czarna.

- merytoryczną, dyskusyjną niedoskonałością pracy o innym charakterze jest wybór analizowanych pigmentów z grupy antocyjanów. Czy opierał się on na rzetelnej wiedzy o składzie antocyjanów w gatunkach roślin objętych analizą, czy wynikał z dostępności substancji wzorcowych? W ramach pracy analizą objęto keracyjaninę, która nie należy do związków powszechnie występujących w świecie roślin.

Z badań fitochemicznych Zespołu Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ-CM dotyczących owoców aronii czarnoowocowej wynika, że ilościowo dominują w nich różne glikozydowe połączenia cyjanidyny, glukozyd, galaktozyd i arabinozyd. Może to być zachętą do kontynuacji badań zaprezentowanych w ramach ocenianej pracy, a także do ich rozszerzenia o wymienione, inne glikozydowe połączenia cyjanidyny oraz o pochodne malwidyny, czy petunidyny.

Podsumowując, przedłożoną do recenzji pracę oceniam wysoko. Jest ona bogatym kompendium wiedzy dokumentującym możliwość wykorzystania różnych klasycznych i nowoczesnych technik chromatografii cienkowarstwowej w kontroli zawartości pigmentów roślinnych z grupy antocyjanów i betacyjanin w produktach spożywczych oraz neolignanów w suplementach diety. Wyniki pracy będzie można wykorzystać w kontroli jakości produktów spożywczych i/lub suplementów diety dostępnych na rynku polskim. Opracowana metodyka oznaczeń antocyjanów będzie mogła być wzorem do opracowania metodyki uwzględniającej skład chemiczny leczniczych surowców antocyjanowych z zamiarem jej wykorzystania w celu potwierdzania tożsamości roślinnych surowców leczniczych i ich standaryzacji.

Uzyskane przez Autorkę wyniki badań są nowatorskie, posiadają istotne walory poznawcze, ale równocześnie potencjalnie aplikacyjny charakter. Wyniki zostały opublikowane w formie 4 publikacji w specjalistycznych czasopismach o profilu chromatograficznym z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania IF = 13,613. Są to wystarczające argumenty za wyróżnieniem pracy!

Ocena dorobku naukowego

Mgr Eliza Łata jako studentka studiów doktoranckich w zakresie nauk chemicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach jest Współautorką aż jedenastu oryginalnych publikacji naukowych. Wszystkie publikacje dotyczą problematyki naukowej z zakresu chemii analitycznej, w tym szczególnie technik chromatografii cienkowarstwowej oraz reakcji peptydyzacji różnych proteinogennych aminokwasów.

Cztery oryginalne publikacje związane są z realizacją ocenianej pracy doktorskiej. Wyniki pracy doktorskiej zostały opublikowane, jak wspomniano powyżej w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej, co świadczy o wysokim poziomie merytorycznym, oryginalności i atrakcyjności uzyskanych wyników: są to czasopisma: Journal of Chromatography A (3 publikacje) oraz Journal of Chromatographic Science (1 publikacja). Prace te powstały w latach 2017-2020. We wszystkich czterech pracach Mgr E. Łata jest pierwszym, głównym Autorem. Łączna wartość współczynnika oddziaływania tych prac IF wynosi 13,613.

Pozostałe prace, nie związane bezpośrednio z realizacją pracy doktorskiej, powstałe w latach 2018-2021 zostały opublikowane w czasopiśmie Reaction Kinetics, Mechanism and Catalysis (6 prac) oraz w czasopiśmie Frontiers in Chemistry. Łączna wartość współczynnika oddziaływania tych prac IF wynosi 15,932.

We wszystkich wymienionych 7 publikacjach Mgr Eliza Łata jest drugim ze Współautorów. Jej współautorstwo w tych pracach dowodzi zarówno Jej zainteresowań naukowych, jak i pozycji w Jednostce, w której realizowała swoją pracę doktorską. Całość wymienionego dorobku publikacyjnego to dorobek z okresu zaledwie ok. 5 lat (2017-2021), co świadczy o bardzo dużej aktywności naukowej Doktorantki. Uzupełnieniem aktywności publikacyjnej są liczne publikacje konferencyjne, w łącznej liczbie 7 prezentacji posterowych, 3 ustnych i 2 innych,

prezentowane na zjazdach krajowych, międzynarodowych w kraju i zagranicznych (Belgrad – 2018, 2021 r.).

Imponujący dorobek naukowy i duża aktywność naukowa Pani Mgr Elizy Łata wskazują, że jest ona bardzo dobrym Kandydatem do uzyskania stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Poziom pracy doktorskiej, powodzenie w jej opublikowaniu Doktorantka zawdzięcza w dużym stopniu wysokiej pozycji naukowej P. Prof. dr hab. Mieczysława Sajewicza – promotora pracy oraz możliwości korzystania z ogromnego doświadczenia i wiedzy P. Prof. dr hab. Teresy Kowalskiej – wielkiego autorytetu naukowego, co chciałabym wyraźnie podkreślić, nie umniejszając równocześnie talentu badawczego samej Doktorantki.

Wniosek końcowy

Biorąc pod uwagę przedstawioną powyżej wysoką ocenę merytoryczną i metodologiczną rozprawy doktorskiej oraz bardzo wysoką ocenę dorobku i aktywności naukowej, zwracam się do Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego z wnioskiem o dopuszczenie Pani Mgr Elizy Łaty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z pełnym przekonaniem wnioskuje również o wyróżnienie pracy!


Uzasadnienie wyróżnienia pracy

Oceniana praca doktorska Pani Mgr Elizy Łata jest oryginalnym osiągnięciem Autorki, posiada liczne elementy naukowej nowości w zakresie analiz trzech grup związków – antocyjanów, betalain i neolignanów. Wyniki pracy posiadają nie tylko wartość poznawczą, ale również potencjalnie aplikacyjny charakter.

Wyniki pracy zostały opublikowane w formie 4 publikacji w renomowanych czasopismach z listy filadelfijskiej – w J. Chromatogr. A (3 publikacje) i w J. Chromatogr. Sci. (1 publikacja) o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 13,613$, co świadczy o wysokim poziomie merytorycznym prowadzonych badań.

Kraków, 16.05.2022 r.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Botaniki Farmaceutycznej UJ CM


prof. dr hab. Halina Ekiert