



Prof. dr hab. Bogusława Czarnik-Matusewicz

Wrocław, 17 wrzesień 2014

Recenzja pracy doktorskiej

**Analiza wtórnych metabolitów roślin przy użyciu metod spektroskopii oscylacyjnej oraz  
obliczeń kwantowo-chemicznych**

wykonanej przez Pana Macieja Wojciecha Romana

pod kierunkiem Prof. dr hab. Małgorzaty Barańskiej

w Zespole Obrazowania Ramanowskiego

Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

Praca została wykonana w Zakładzie Obrazowanie Ramanowskiego, bardzo dobrze wyposażonym w najnowsze techniki spektroskopii oscylacyjnej. W takiej sytuacji bardzo ważnym był dobór układów pomiarowych i metod ich analizy, która decydowała o atrakcyjności całej rozprawy. Podstawą badań była analiza trzech grup wtórnych metabolitów roślin z wykorzystaniem metod chemii kwantowej i teoretycznym opisem widm oscylacyjnych, aż do identyfikacji i określenia dystrybucji analizowanych związków w materiale roślinnym z wykorzystaniem metod chemometrycznych. Tak postawiony temat dla istotnej grupy związków do chwili obecnej nie był przedmiotem badań co stanowiło atrakcyjny temat pracy doktorskiej.

W części wprowadzającej Doktorant przedstawił w sposób zwięzły zastosowanie praktyczne spektroskopii oscylacyjnej poprzez spektroskopię osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni oraz klasyczną spektroskopię ramanowską, mapowanie ramanowskie wraz z konfokalnym mikroskopem w celu analizy od uśrednionego rozkładu związku lub rozkładu przestrzennego na powierzchni warstwy lub całej objętości próbki. Wraz z ramanowską aktywnością optyczną w celu identyfikacji substancji chiralnej. Następnie scharakteryzował wybranymi metodami teoretycznymi, niezbędne w interpretacji wyników doświadczalnych, obliczenia kwantowo-chemicznej struktury elektronowej. Główny opis skupił na metodzie DFT i dwóch bazach funkcyjnych zaproponowanych przez Pople'a i Dunninga. Dzięki zastosowaniu analizy PED dokonał teoretycznej interpretacji widm oscylacyjnych dokonując przypisania

pasmom odpowiednich drgań normalnych. Doktorant pisze, że w celu lepszego odwzorowania częstości teoretycznych z częstościami doświadczalnymi na poziomie teorii zastosował przybliżenie anharmoniczne, dzięki czemu był w stanie uwzględnić nadtony i drgania wywołane zjawiskiem rezonansu Fermiego. Niestety, jak pokazują wartości energii drgań umieszczone w tabelach jedynie zastosował do przybliżenia harmonicznego wartości skalujące. Nadtony i przejścia wywołane zjawiskiem RF nie odzwierciedlają obliczenia harmoniczne, a są wynikiem niezgodności z eksperymentem. Doktorant zaproponował zastosowanie analizy ilościowej w oparciu o metodą regresji liniowej PLS do zestawu widm oscylacyjnych, których zależność w funkcji zmieniającego się czynnika wykazuje liniową zależność. Kolejną metodą chemometryczną, którą przedstawił w części wprowadzającej była analiza skupień. Procedura ta została zaprezentowana z punktu rozróżnienia między innymi różnych procesów syntezy na zawartość karotenoidów. Podsumowując tę część pracy na szczególną uwagę zasługuje szeroki wachlarz doświadczalnych metod spektroskopii oscylacyjnej, połączonych z dobrze wybranymi metodami chemii kwantowej wraz z metodami analizy wielowymiarowej łączącej część doświadczalną z obliczeniami oraz metody klasyfikacji obiektów o złożonym wpływie czynników zewnętrznych na ich obraz spektralny.

Kolejną częścią pracy było wprowadzenie teoretyczne dla trzech grup wtórnych metabolitów roślin. Są to poliacetyleny, karotenoidy i alkaloidy, dla których część literaturowa poprzedzała wyniki i dyskusję dla każdej grupy tych trzech związków. Jest to bardzo dobry zabieg, podział części wprowadzającej na dwie partie, dzięki czemu część metodyczna i część opisowa dla tych związków zachowały swoją niezależność. Dla każdego związku dowiadujemy się o syntezie, biosyntezie i funkcjach w roślinach oraz zastosowaniu spektroskopii oscylacyjnej w opisie analizy drgań od prostych cząsteczek do składników wchodzących w preparaty o znaczeniu biologicznym. Na uwagę zasługuje bogata bibliografia składająca się aż z 302 pozycji. Zarówno liczba cytowań jak też ich dobór świadczą o dobrej znajomości tematyki będącej przedmiotem rozprawy doktorskiej.

Część pierwszą Doktorant poświęca poliacetylenom, w tej grupie przebadał aż 35 związków - od prostych do bardziej rozbudowanych analogów. Korzystając na tym etapie z analizy PLS wyznaczył korelacje pomiędzy właściwościami elektronowymi podstawników, które obliczył na podstawie deskryptorów określających stopień przeniesienia elektronów  $\sigma$  i elektronów  $\pi$ , a parametrami geometrycznymi oraz częstościami drgań charakterystycznymi układu diacetylenowego. Do tego celu użył długości wiązania  $C\equiv C$  oraz drgań  $\nu_{as}$  i  $\nu_s$  grupy  $C\equiv C$ . Doktorant pokazał, że wzrost właściwości elektronowo-donorowych podstawnika prowadzi do zwiększenia długości wiązań  $C\equiv C$ , a co za tym idzie obniżenia częstości drgań charakterystycznych. Największy efekt obserwował dla podstawników zawierających atomy metali pierwszej i drugiej grupy. Natomiast najsilniejsze właściwości elektronoakceptorowe stwierdził dla podstawnika  $-F$ , a użyte częstości drgań  $\nu(C\equiv C)$  przyjmują najwyższą wartość. Niestety nie uzyskał istotnej korelacji między deskryptorami, czy parametrami geometrycznymi a intensywnością pasm charakterystycznych, pomimo że zachodziły duże zmiany w widmie podczerwonym i widmie RS. Czy w tym przypadku użycie tylko dwóch z czterech efektów

podstawnikowych, z pominięciem czynnika pola indukowanego, a przede wszystkim polaryzowalności prowadzi do brak korelacji liniowej?

Kolejną grupą związków, którą poddano szczegółowym obliczeniom teoretycznym i przeprowadzono pomiary spektroskopowe było sześć prostych diacetylenów oraz trzy kwasy diacetylenowe, które zawierają w swojej strukturze długie łańcuchy alifatyczne. Na podstawie obliczeń kwantowych uzyskano stabilne struktury elektronowe, w kolejnym etapie dokonano symulacji widm oscylacyjnych, co posłużyło do interpretacji widm doświadczalnych, w których wzięto pod uwagę obecność rezonansu Fermiego między drganiami  $\nu_s(\text{C}\equiv\text{C})$  a nadtonami drgania  $\nu(\equiv\text{C}-\text{C}\equiv)$  lub  $\nu(-\text{C}-\text{C}\equiv)$ .

Szczególnie ważne było pokazanie jak polimerazacja wywołana pod wpływem promieniowania UV i temperatury wpływa na przesunięcie charakterystyczne poliacetylenów. Zastosowanie techniki mapowania ramanowskiego pozwoliło uzyskać obraz dystrybucji badanych związków w korzeniach kilku odmian marchewki dzikiej oraz w korzeniach pasternaku, pietruszki i selera na podstawie wyznaczonych częstości drgań. W ten sposób od teoretycznego podejścia dla prostych cząsteczek diacetylenów Doktorant w sposób systematyczny przeanalizował szereg złożonych zależności, jakie pozwalają na analizę rozkładu poliacetylenów w produktach roślinnych.

Taki sam schemat postępowania Doktorant zastosował także w przypadku karotenoidów i alkaloidów. Analizując nienasycone węglowodory o sprzężonych wiązaniach podwójnych istotną uwagę poświęcił roli czynników zewnętrznych, takich jak stosowany rozpuszczalnik, kwasowość roztworu czy stres temperaturowy na strukturę standardowych karotenoidów. Widma charakterystyczne dla tych związków pochodziły od drgań łańcucha polienu podzielonego na trzy zakresy, które w różnym stopniu wykazują się zależnością od długości łańcucha, końcowych podstawników polienu i oddziaływaniem z cząsteczkami rozpuszczalnika. Doktorant wykorzystał obydwie procedury chemometryczne w określeniu wpływu nawodnienia i warunków przechowywania na zawartość i skład karotenoidów w korzeniach marchwi uprawnej oraz w ilościowym wyznaczeniu karotenoidów. Wykorzystał cały zestaw technik spektralnych łącznie z połączeniem z mikroskopem konfokalnym, które pozwala określić dystrybucję karotenoidów w kryształach występujących w komórkach korzeni marchwi. Udokumentowane przez Doktoranta rozwiązanie ma potencjalne aplikacyjne zastosowanie w procesie badania jakości marchwi przeznaczonej do przemysłu spożywczego. Zbudował ilościowy model do oznaczania karotenoidów na podstawie widm spektroskopowych bazując na podstawie pasm charakterystycznych. W przeciwieństwie do poliacetylenów, których mapowanie ramanowskie wykazało rozkład w małych obszarach znajdujących się w pobliżu skóry, w przypadku karotenoidów uzyskano obraz ich homogenicznej dystrybucji.

Ostatnią grupę związków stanowiły alkaloidy, które pochodziły z drzewa chinonowego: chinina, chinidyna, cynochinina i cynchonidyna. Związki o udokumentowanym od lat zastosowaniu farmaceutycznym i spożywczym. W przypadku tych układów, ze względu na chiralną strukturę aktywną optycznie, Doktorant zastosował po raz pierwszy w pracy metodę ramanowskiej aktywności optycznej.

Określił na podstawie przebiegów ROA pseudoenancjomery o tej samej strukturze molekularnej oraz związku o tej samej konfiguracji absolutnej, ale różniące się obecnością dodatkowych grup funkcyjnych. Poprzez zestawienie spektroskopowych i teoretycznych wyników ROA w funkcji wpływu pH na strukturę i widma alkaloidów drzewa chinowego Doktorant pokazał przydatność tej metody do śledzenia zmian strukturalnych wywołanych procesem protonacji spowodowanych rosnącą kwasowością roztworów wodnych chininy. Również badania z zastosowaniem konfokalnego spektrofotometru dla tabletek leku Limptar<sup>®</sup>N potwierdziły obecność chininy o stosunkowo homogeniczny rozkładzie.

Najlepszym posumowaniem przedstawionej recenzji jest spis publikacji, jakie powstały na podstawie przedstawionego materiału. Jest to aż osiem publikacji w czasopismach z listy filadelfijskiej, które ukazały się na przestrzeni czterech lat plus dwu artykuły oczekujące na recenzję. Świadczy to o dojrzałości Doktoranta w przygotowaniu materiału nie tylko do pracy doktorskiej, ale do końcowego opublikowania. Uważam, że przedstawiona rozprawa doktorska Pana Macieja Romana z nadmiarem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim. Biorąc pod uwagę zebrane wyniki, ich staranne opracowanie oraz wysoką jakość całości przedstawionego materiału składam **wniosek o wyróżnienie rozprawy.**

Podsumowując, stawiam wniosek o dopuszczenie Pana Macieja Wojciecha Romana do dalszych etapów przewodu doktorskiego zgodnie z warunkami określonymi w Ustawie „O stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z dnia 14 marca 2003 roku).

Zapustawa Cramnik-Motusiewicz