

Dr hab. inż. Maciej Sitarz Prof. AGH
Akademia Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica
Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki
Katedra Chemii Krzemianów i Związków Wielkocząsteczkowych
30-059 Kraków
Al. Mickiewicza 30

Kraków 15.08.2014

OCENA

rozprawy doktorskiej mgr Macieja Romana

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

opracowana na zlecenie Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego

1. Charakterystyka pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Macieja Romana poświęcona jest w głównej mierze badaniom spektroskopowym wybranych metabolitów wtórnych występujących w roślinach. Metabolity wtórne występują w roślinach w bardzo małych ilościach (poniżej 1%), co stwarza bardzo duże problemy związane z ich detekcją. Pomimo tak niskiej zawartości metabolity wtórne odgrywają bardzo ważną rolę w przystosowywaniu się roślin do zmieniających się warunków środowiskowych. Z uwagi na swoje różnorodne właściwości związki te mają również niebagatelne znaczenie w codziennym życiu człowieka i są szeroko wykorzystywane w przemyśle farmaceutycznym, chemicznym oraz kosmetologii. Wszystko to sprawia, że podejmowanie prac związanych z analizą struktury, własności oraz występowania różnych metabolitów wtórnych jest jak najbardziej uzasadnione. Jest to niezwykle interesujące z punktu widzenia poznawczego jak również, z uwagi na wspomniane powyżej znaczenie metabolitów wtórnych, także utylitarne.

W pracy podjęto badania nad wybranymi metabolitami wtórnymi roślin należących do trzech grup związków: poliacetylenów, karotenoidów i alkaloidów. Głównym problemem przy badaniach metabolitów wtórnych jest ich niska zawartość w badanych materiałach roślinnych. Do ich badania powszechnie stosuje się metody chromatograficzne, które wymagają jednak ekstrakcji metabolitów wtórnych z materiału roślinnego. Jak stwierdził Autor może to powodować, i moim zdaniem najczęściej powoduje, znaczące zmiany w ich strukturze. W związku z czym zaproponował wykorzystanie spektroskopii oscylacyjnej w podczerwieni i Ramana, które pozwalają na wykonywanie pomiarów *in situ*. Taki wybór metod jest jak najbardziej uzasadniony biorąc pod uwagę rodzaj badanych materiałów oraz rozwój metod

spektroskopowych. Oczywiście wybór takich a nie innych metod badawczych nie może również dziwić z uwagi na osobę promotora doktoratu. Autor już we wstępie stwierdził, że samo użycie metod spektroskopowych nie rozwiązuje wszystkich problemów, gdyż pojawiają się bardzo duże problemy związane z interpretacją uzyskanych widm. Wynika to w głównej mierze ze złożonego charakteru widm przejawiającego się obecnością dużej liczby, często nakładających się pasm. Sprawia to, że często bardzo trudno jest określić pasmo/a charakterystyczne, pozwalające w sposób jednoznaczny identyfikować poszczególne związki. Mając świadomość tego problemu Autor zaproponował wykorzystanie obliczeń kwantowo-chemicznych do określenia położenia pasm charakterystycznych dla poszczególnych grup wybranych metabolitów wtórnych.

Identyfikacji i ustaleniu położenia pasm charakterystycznych i następnie wykorzystaniu uzyskanych informacji do interpretacji widm materiałów roślinnych poświęcona jest zasadnicza część rozprawy Pana mgr Macieja Romana.

Ocenianą rozprawę należy zliczyć do gatunku obszernych gdyż obejmuje ponad 200 stron. Przedstawiona do oceny praca ma nieco odmienny kształt od większość tego typu prac. Na początku Autor tradycyjnie zamieścił wprowadzenie, w którym znalazły się wstęp do tematu rozprawy, przegląd literatury na temat stosowanych technik badawczych oraz metod obliczeniowych oraz cel i zakres badań własnych. Odstępstwem od klasycznego układu pracy jest zasadnicza część rozprawy obejmująca wyniki badań własnych z dyskusją. Została ona podzielona na trzy części z których każda zawiera krótki wstęp literaturowy oraz wyniki badań z dyskusją dla poszczególnych grup metabolitów wtórnych. Z uwagi na objętość i charakter przedstawionego materiału, taki układ pracy uważam za bardzo korzystny z punktu widzenia czytelnika. Całość pracy zakończona jest tradycyjnie podsumowaniem oraz spisem literatury. Na podkreślenie zasługuje również zamieszczenie klarownego opisu wszystkich stosowanych w pracy skrótów. Jest to bardzo dobry zwyczaj znacząco ułatwiający czytanie pracy.

2. Ocena merytoryczna pracy

W pierwszym trzech rozdziałach rozprawy doktorant przedstawił kolejno wstęp, opis używanych metod badawczych oraz opis wykorzystywanych metod teoretycznych.

W krótkim wstępie Autor w zwięzły sposób przedstawił czym są metabolity, jakie pełnią funkcje oraz ich znaczenie i możliwości praktycznego wykorzystania. Opisane zostały również główne problemy związane z identyfikacją i badaniem wtórnych metabolitów roślin oraz Jego pomysł na przezwycięzenie tych trudności.

W drugim i trzecim rozdziale rozprawy doktorant przedstawił zwięzły opis wykorzystywanych w pracy metod badawczych tj. spektroskopii Ramana i w podczerwieni oraz metod teoretycznych, skupiając się na wykazaniu ich przydatności do założonych celów. Analiza tej części rozprawy doktorskiej pozwala łatwo zrozumieć czym kierował się Autor przy wyborze poszczególnych metod. Przedstawione opisy wskazują, że doktorant ma świadomość możliwości ale i ograniczeń wybranych metod badawczych i teoretycznych.

Rozdział wprowadzenie kończy się przedstawieniem głównych celów przeprowadzonych badań, którymi było znalezienie zależności pomiędzy strukturą elektronową a widmem oscylacyjnym wybranych związków oraz wykazanie przydatności wybranych metod do identyfikacji i określania dystrybucji wybranych metabolitów wtórnych w materiale roślinnym i produktach farmaceutycznych.

Zasadniczą część rozprawy doktorskiej stanowią trzy rozdziały poświęcone odpowiednio trzem różnym grupom metabolitów wtórnych tj. poliacetylenom, karotenoidom i alkaloidom. Każdy z tych trzech rozdziałów rozpoczyna się krótkim przeglądem literaturowym dotyczącym danej grupy metabolitów wtórnych mówiącym o ich występowaniu, znaczeniu, przykładach badań za pomocą spektroskopii oscylacyjnej. Autor uwzględnił w sumie aż 302 pozycje literaturowe opublikowanych głównie po 2000 roku. Tak ogromna liczba cytowanych prac oraz ich „świeżość” świadczy zarówno o aktualności podjętej tematyki jak i dogłębnym jej poznaniu przez doktoranta. Każdorazowo przedstawiono również szczegółowy opis przedmiotu badań tj. wybranych związków oraz metod i warunków w jakich były prowadzone obliczenia i poszczególne badania spektroskopowe.

Przeprowadzone w pierwszej kolejności, dla każdej z trzech grup wybranych metabolitów wtórnych, modelowe obliczenia teoretyczne są bardzo ważnym elementem ocenianej rozprawy, pozwalającym na lepsze zrozumienie relacji pomiędzy strukturą elektronową, a widmami oscylacyjnymi badanych związków. Obliczenia te wykonano za pomocą programu Gaussian09, stosując formalizm teorii funkcjonału gęstości z funkcjonałem wymiany - korelacji B3LYP oraz bazy funkcyjne cc-pVDZ i aug-cc-pVDZ Dunninga i 6-31G(d,p) Pople'a. W przypadku każdej badanej cząsteczki Autor wykonał analizę konformacyjną, której celem była identyfikacja wszystkich trwałych konformerów, odpowiadających minimom na hiperpowierzchni energii potencjalnej, a ich obliczone, zoptymalizowane geometrie kontrolował obecnością ujemnych wartości własnych odpowiadającego danej geometrii. Uzyskane finalne częstości drgań zostały przeskalowane, celem uwzględnienia odstępstw układów rzeczywistych od zastosowanego w obliczeniach modelu harmonicznego i

ograniczeń zastosowanych baz funkcyjnych. W celu identyfikacji elementów struktury (wiązań, kątów) o największym udziale w danym drganiu normalnym, korzystając z programów Gar2ped i Veda, Autor dokonał dekompozycji całkowitej energii potencjalnej drgań normalnych na przyczynki pochodzące od poszczególnych współrzędnych wewnętrznych, co pozwoliło mu na przypisanie poszczególnym pasmom drgań odpowiednich fragmentów analizowanej cząsteczki. Zastosowane metody uważam za w pełni adekwatne do postawionego problemu badawczego, a sposób wykonania obliczeń i analiza uzyskanych wyników świadczą o bardzo dobrym opanowaniu przez Autora zastosowanych metod teoretycznych i umiejętności ich praktycznego wykorzystania w pracy badawczej.

Pierwszą grupą badanych metabolitów wtórnych były poliacetyleny. Naturalne poliacetyleny, z których najczęściej spotykane to diacetyleny, są szeroko rozpowszechnione w roślinach z rodziny selerowatych np. korzeniach marchwi, pietruszki czy selera. Diacetyleny charakteryzują się występowaniem na widmach oscylacyjnych dwóch pasm związanych z drganiami symetrycznymi i asymetrycznymi potrójnego wiązania węgiel-węgiel, w związku z czym ich identyfikacja wydaje się stosunkowo prosta. Jednakże liczba sprzężonych potrójnych wiązań węgiel-węgiel oraz rodzaj, liczba i położenie podstawników w łańcuchu polimeru mają znaczący wpływ zarówno na ilość jak i położenie pasm. Dlatego też Autor podjął się określenia wpływu tych czynników na strukturę wybranych diacetylenów. Przeprowadzone przez niego symulacje komputerowe na grupie 35 związków oraz badania spektroskopowe na wybranych diacetylenach i kwasach diacetylenowych pozwoliły mu ustalić wpływ różnych czynników na strukturę badanych związków, a co za tym idzie i kształt ich widm oscylacyjnych. Wszystkie te eksperymenty pozwoliły mu ustalić pasma identyfikacyjne dla interesujących go związków oraz wpływ konformacji oraz otoczenia na ich położenie oraz intensywność. Uzyskane informacje posłużyły Doktorantowi do identyfikacji diacetylenów w różnych materiałach roślinnych. Na podstawie badań ramanowskich wykazał, że z poliacetylenów w korzeniach marchwi i selera występuje praktycznie wyłącznie falkarindiol. Mapowanie ramanowskie pozwoliło wykazać, że w przypadku marchwi wstępuje on głównie w tkance łyka, natomiast w przypadku selera w pobliżu skórki. Charakterystyczne jest, że w obu przypadkach jego rozkład przestrzenny w tkankach jest heterogeniczny.

W przypadku korzeni pasternaka oraz pietruszki przeprowadzone badania pozwoliły wykazać obecność, obok falkarindiolu, również znacznych ilości falkarinolu, a być może również innych poliacetylenów. Mapowanie ramanowskie wykazało, że podobnie jak w przypadku korzenia marchwi, poliacetyleny są akumulowane w tkance łyka.

Podobną procedurę tj. przeprowadzenie symulacji komputerowych, badania spektroskopowe modelowych związków oraz wykorzystanie tych informacji do interpretacji widm oscylacyjnych wybranych materiałów roślinnych i produktów farmaceutycznych zastosowano również w przypadku karotenoidów. Karotenoidy, ze względu na ich znaczenie dla człowieka (są prekursorami witaminy A) należą do najlepiej poznanych metabolitów wtórnych. Ze względu na swoją budowę (łańcuch polienu i cykliczne grupy końcowe) karotenoidy posiadają szereg izomerów geometrycznych oraz konformerów. Ponadto ze względu na obecność sprzężonego układu wiązań podwójnych C=C są bardzo wrażliwe na utlenianie i zmianę temperatury. Z tego punktu widzenia niezmiernie istotne są przeprowadzone przez doktoranta obliczenia teoretyczne, które pozwoliły określić najbardziej stabilne konformery β -karotenu, tretynoiny, izotretynoiny oraz etretynatu oraz uzyskać ich teoretyczne widma. Autor wykazał, że na tej bazie, na podstawie pomiarów ramanowskich, można w stosunkowo łatwy i jednoznaczny sposób dokonać identyfikacji wybranych przez niego karotenoidów. Badając wpływ otoczenia (rozpuszczalnik, pH) na strukturę karotenoidów wykazał, że jest to związane z agregacją i hydrolizą. Bardzo ważne są również badania wpływu temperatury na trwałość poszczególnych konformerów β -karotenu, z których wynika, że wzrost temperatury doprowadza do wzrostu udziału konformerów wysokoenergetycznych. Z uwagi na to, że karotenoidy są bardzo często wykorzystywane jako leki lub ich składniki przy wielu schorzeniach, znajomość ich struktury ma kluczowe znaczenie z punktu widzenia ich skuteczności działania i bezpieczeństwa dla zdrowia i życia pacjenta. Związane jest to z niekiedy całkowicie odmiennym działaniem poszczególnych konformerów. Autor pokusił się również o praktyczne wykorzystanie spektroskopii ramanowskiej do oznaczenia ilości karotenoidów w różnych odmianach marchwi oraz określenia wpływu różnych czynników tj. nawodnienia i warunków przechowywania marchwi na zawartość i skład karotenoidów. Wykazał, że spektroskopię ramanowską można wykorzystać do analizy ilościowej karotenoidów w materiałach roślinnych. Jej głównymi zaletami są prostota i szybkość wykonywania pomiarów. Badania wpływu warunków wegetacji (nawodnienie) oraz przechowywania wykazały, że oba te czynniki mają znaczący wpływ na zawartość i skład karotenoidów w marchwi. Szczególnie interesujący z praktycznego punktu widzenia jest wpływ podwyższonej temperatury przechowywania i/lub działania światła. Doktorant wykazał ponad wszelką wątpliwość, że oba te czynniki mają decydujące znaczenie jeżeli chodzi o ilość i skład karotenoidów.

Bardzo ciekawe z poznawczego punktu widzenia jest wykazanie przez Doktoranta heterogenicznego charakteru kryształów karotenoidów obecnych w komórkach marchwi.

Przeprowadzone badanie ramanowskie, w tym mapowanie, pozwoliły wykazać, że kryształy te są mieszaniną kilku karotenoidów.

Ostatnią grupą badanych metabolitów wtórnych były alkaloidy drzewa chinowego (chinina, chinidyna oraz cynchonina i cynchonidyna) dla których, podobnie jak dla dwóch poprzednich grup, zastosowano podobną procedurę badawczą. Wybrane alkaloidy, podobnie jak karotenoidy cechują się istnieniem wielu konformerów. Przeprowadzone symulacje komputerowe oraz badania spektroskopowe pozwoliły jednoznacznie stwierdzić Autorowi, że widma oscylacyjne związków o tej samej strukturze cząsteczkowej są do siebie bardziej podobne niż widma związków o tej samej konfiguracji absolutnej. Analiza widm teoretycznych oraz eksperymentalnych IR i Ramana pozwoliła na wskazanie pasm markerowych na widmach MIR, pozwalających na w miarę precyzyjne rozróżnienie poszczególnych pseudoenancjomerów. Niestety klasyczne pomiary ramanowskie nie pozwalają na taka identyfikację. W związku z czym Autor zaproponował wykorzystanie chiralności badanych związków, która pozwala wykorzystać metody oparte na oscylacyjnej aktywności optycznej. Wykazał ponad wszelką wątpliwość, że użycie metody ROA (ramanowska aktywność optyczna) pozwala na jednoznaczną i stosunkowo prostą identyfikację badanych pseudoenancjomerów. Przeprowadzając badania spektroskopowe dystrybucji chininy w lekach oraz wpływu pH na strukturę wybranych alkaloidów udowodnił, że jego badania mogą znaleźć praktyczne zastosowanie np. w przemyśle farmaceutycznym.

Oceniając całość pracy należy stwierdzić, że stanowi ona oryginalne podejście, z zastosowaniem nowoczesnych metod badawczych, do opisu struktury metabolitów wtórnych oraz analizy ich zawartości i rozmieszczenia w materiałach roślinnych czy farmaceutycznych. Sposób przedstawienia wyników badań oraz ich interpretacja wskazują na bardzo dobre przygotowanie Doktoranta zarówno w zakresie chemii teoretycznej jak eksperymentalnej. Szczegółowy opis przeprowadzonych eksperymentów i bardzo klarowny sposób interpretacji uzyskanych wyników badań stawia recenzenta w kłopotliwej sytuacji, gdyż trudno z nimi polemizować zwłaszcza, że zostały już zweryfikowane przez recenzentów kilkunastu artykułów opublikowanych przez Doktoranta.

Recenzowano praca, jak każda tego typu praca, zawiera oczywiście kilka drobnych wad i niezręcznych sformułowań. Bardzo miłym zaskoczeniem natomiast jest praktycznie całkowity brak błędów gramatycznych oraz tzw. literówek.

Z poważniejszych uwag merytorycznych i polemicznych wymienić bym następujące:

- Str. 32. Powinno się wg. mnie pisać "macierz Hessego" (od nazwiska matematyka niemieckiego Ludwiga Hessego, vide SJP: <http://sjp.pl/hesjan>) lub w skrócie "hesjan", a nie

"macierz Hessianu", bo jest to niepotrzebny i (na szczęście) rzadko pojawiający się anglicyzm od "Hessian matrix".

- Str. 32 Sformułowanie "zbudowanie macierzy masowo-ważonych stałych siłowych" brzmi trochę niezręcznie - lepiej napisać "zbudowanie macierzy stałych siłowych skalowanych (lub ważonych) masą (ang. mass-weighted force constant matrix).

- W całej pracy powtarza się częsty błąd lub raczej „wulgaryzm naukowy” np. str. 43, „...a widmo w zakresie pasm rozciągających...” – powinno być w zakresie drgań rozciągających. Nie ma czegoś takiego jak pasma rozciągające – pasma o których pisze Autor pochodzą lub są związane z drganiami rozciągającymi. (to samo jest np. na str. 67, 98, 140, 141 i innych).

Str. 65 „W związku z tym drganie v_s jest widoczne tylko na widmie IR, a drganie v_{as} na widmie RS”. W rzeczywistości jest dokładnie na odwrót.

-Str. 75. Autor przedstawia porównanie widm IR uzyskanych techniką transmisyjną i ATR w celu uzasadnienia wyboru techniki pomiarowej. Mam duże wątpliwości co do słuszności wyboru techniki ATR. Przedstawione widmo IR (rys. 7.5) zmierzone techniką transmisyjną jest dużo lepszej jakości zwłaszcza w analizowanym później przez Autora zakresie. Autor stwierdza, że problemem jest pojawienie się pasm związanych z wodą higroskopijną. Z nieznanymi mi przyczyn nie nastąpiła pełna rekompensata pasm związanych z cząsteczkami wody. Przecież tak samo absorbuje wilgoć KBr czysty jak i z dodatkiem ok. 2 mg badanej próbki?

- Ogólna uwaga co do rysunków przedstawiających złożenia widm – są one zdecydowanie za małe co znacząco utrudnia czytanie pracy. Rozumiem jednak, że Doktorant nie chciał już „rozmnażać” i tak obszernej pracy.

- Str. 83. Napisano, że „Obecność zanieczyszczeń w badanej próbce została wykluczona na podstawie pomiaru NMR...” Brakuje doprecyzowania na jakich jądrach były prowadzone badania.

- Na jakiej podstawie (intuicja, dane literaturowe, zgodność z widmami eksperymentalnymi?) dobrane zostały współczynniki skalujące w różnych zakresach widm IR i Ramana?

- Na str. 148 przedstawione są rozkłady widm Ramana. Niestety nigdzie nie znalazłem parametrów przy jakich prowadzone były rozkłady tj. jakie zostały użyte funkcje, czy zakładano z góry położenie i szerokość poszczególnych pasm itp. Jest to ważne gdyż dla osób wykonujących rozkłady jest rzeczą oczywistą, że każde widmo można rozłożyć zgodnie z życzeniem „klienta”.

- Str. 166. Dla widm przedstawionych na rys. 10.21D zasadnym byłoby przeprowadzić rozkład na pasma składowe. Uczyniłoby to widma bardziej czytelnymi i znacząco ułatwiło interpretację.

- Str. 191. Autor zapisał tytuł podrozdziału jako „*Wpływ pH na strukturę i widma alkaloidów drzewa chinowego*”. Słowo widma jest tu zupełnie niepotrzebne. Nie wypada a powiedziałbym nawet, zważywszy na wysoki poziom recenzowanej pracy, że nie wolno traktować widm jak obrazków. Widma są tylko odbiciem struktury, więc jeżeli zachodzą zmiany w strukturze to na pewno również na widmach. Traktuję to jako swego rodzaju żargon naukowy.

Str. 196. Linia 1-3. Napisano że, na intensywność pasm przy 2850 i 2916 cm^{-1} oprócz chininy mogą mieć również wpływ drgania od SiO_2 i talku. Jeżeli chodzi o SiO_2 , to zapewniam, że niezależnie od odmiany polimorficznej (a jest ich wiele) w tym zakresie widma IR nie pojawiają się żadne pasma. Dotyczy to również talku. Wprawdzie talk jako hydroksykrzemian posiada w swej strukturze grupy OH⁻ ale pasma związane z drganiami tych grup występują na widmie IR talku przy ok. 3670 i 3660 cm^{-1} . Podobny błąd w interpretacji widm IR jest nieco poniżej (linia 13) „...gdzie obecne są pasma pochodzące od żelatyny, celulozy, celulozy mikrokrystalicznej oraz talku”. Powinno być jeszcze SiO_2 , który jak każdy krzemian posiada kilka charakterystycznych pasm w analizowanym zakresie.

Wymienione przeze mnie drobne potknięcia w żadnym stopniu nie umniejszają mojej bardzo wysokiej oceny recenzowanej pracy. Na koniec chciałbym podkreślić moje wielkie uznanie dla biegłości Pana mgr Macieja Romana w posługiwaniu się różnymi metodami obliczeń teoretycznych oraz przy wykonywaniu skomplikowanych eksperymentów i zdolności interpretacji uzyskanych wyników badań.

3. Wniosek końcowy

Opiniowana praca spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez ustawę z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) i na tej podstawie wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr Macieja Romana do publicznej obrony rozprawy przed Radą Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Jednocześnie z uwagi na wysoki poziom recenzowanej rozprawy zgłaszam wniosek o wyróżnienie pracy.

S. Tom *Boć*