



Prof. dr hab. Antoni Szumny

Wrocław, 2023-05-04

Recenzja Rozprawy Doktorskiej  
Pani mgr inż. Karoliny Wawrzyńczak pt.:

*„Olejki eteryczne i hydrolaty z wybranych roślin – skład chemiczny i właściwości biologiczne”*

wykonanej w Instytucie Surowców Naturalnych i Kosmetyków na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej

promotor prof. dr hab. Danuta Kalemba

promotor pomocniczy: Agnieszka Krajewska

### **Uwagi ogólne na temat przedstawiony w dysertacji**

Tematyk analizy składu związków lotnych, ze szczególnym uwzględnieniem olejków eterycznych jest przedmiotem co najmniej kilkuset (wg bazy Scholar) publikacji rocznie. Szczegółowa identyfikacja składu jest dzisiaj rutynowym elementem analiz jakościowych nie tylko w laboratoriach badawczych, ale też i działów kontroli jakości firm zajmujących się produkcją opartą na surowcach olejkowych. Coraz lepsze bazy danych, algorytmizacja analiz poprzez zastosowanie stosownych oprogramowań, dostępność wielu wzorców powoduje że szczegółowy skład jakościowy i ilościowy związków lotnych jest możliwy do niemal natychmiastowego określenia, nawet przez początkujący personel badawczy. Z pozoru, tematyka analiz olejków eterycznych jest już pełna wyczerpujących prac badawczych i brak jest obszarów, w których można by odnaleźć nieodkryte zagadnienia. Jednak wybór badań składu jakościowego i ilościowego hydrolatów jest niezwykle trafny. Bardzo mało jest w publikacji w tym obszarze, o wykonanie ich niepodważalnych analiz wykracza znacznie ponad rutynowe postępowanie. Hydrolaty wydają się być zagadnieniem rozpoznawalnym, gdzie dobór odpowiedniej metodyki badawczej wymaga z w każdorazowym przypadku indywidualnego podejścia. Brak jest też wielu



doniesień w obszarze badań biologicznych frakcji hydrolatowej. Z tego powodu uznaję wybór tematyki dysertacji - przez jeden z największych krajowych autorytetów w obszarze badań olejków eterycznych prof. Danutę Kalembę i jego realizację przez Doktorantkę za wszech miar słuszny.

### Ocena celu pracy i metodologii badań, służących rozwiązaniu

#### podjętych problemów i wyników

W przedstawionej dysertacji Autorka podjęła się uzupełnienia stanu wiedzy w obszarze identyfikacji jakościowej i ilościowej hydrolatów oraz olejków eterycznych woskownicy europejskiej (*Myrica gale*), hyzopu lekarskiego (*Hyssopus officinalis*), cedrzyńca kalifornijskiego (*Calocedrus decurrens*) i czterech gatunków nawłoci (*Solidago canadensis*, *gigantea*, *virgaurea*, *niederederii*) oraz jednego mieszańca nawłoci kanadyjskiej i pospolitej. Uzyskane hydrolaty i olejki zostały również przebadane wobec wybranych drobnoustrojów. Doktorantka zaplanowała również badanie efekty fitotoksycznego wobec siewek pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*) oraz gorczycy białej (*Synaps alba*).

Stwierdzam, że wszystkie postawione przed sobą cele badawcze zostały przez Doktorantkę całkowicie zrealizowane.

Świadczy to nie tylko o bardzo dobrze zorganizowanym warsztacie badawczym, ale też o wielkim nakładzie pracy eksperymentalnej, którą Autorka wymienionej dysertacji musiała wykonać. Przy tak licznej grupie badawczej oraz wykonanych powtórzeniach, szacowana przeze mnie ilość analiz chromatograficznych (GC-MS) prezentowanych w dysertacji wynosi około stu, więc czas włożony w precyzyjną i szczegółową interpretację musiał być naprawdę olbrzymi. Nawet dla piszącego te słowa jedna tylko przedstawiona w części doświadczalnej tabela ze składem to niekiedy nawet tydzień pracy.

Metodyka analityczna stosowana w trakcie realizacji pracy doktorskiej była standardowa dla tego typu badań. Pani Karolina Wawrzyńczak posłużyła się techniką chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem masowym (GC-MS). Do identyfikacji ilościowej Doktorantka

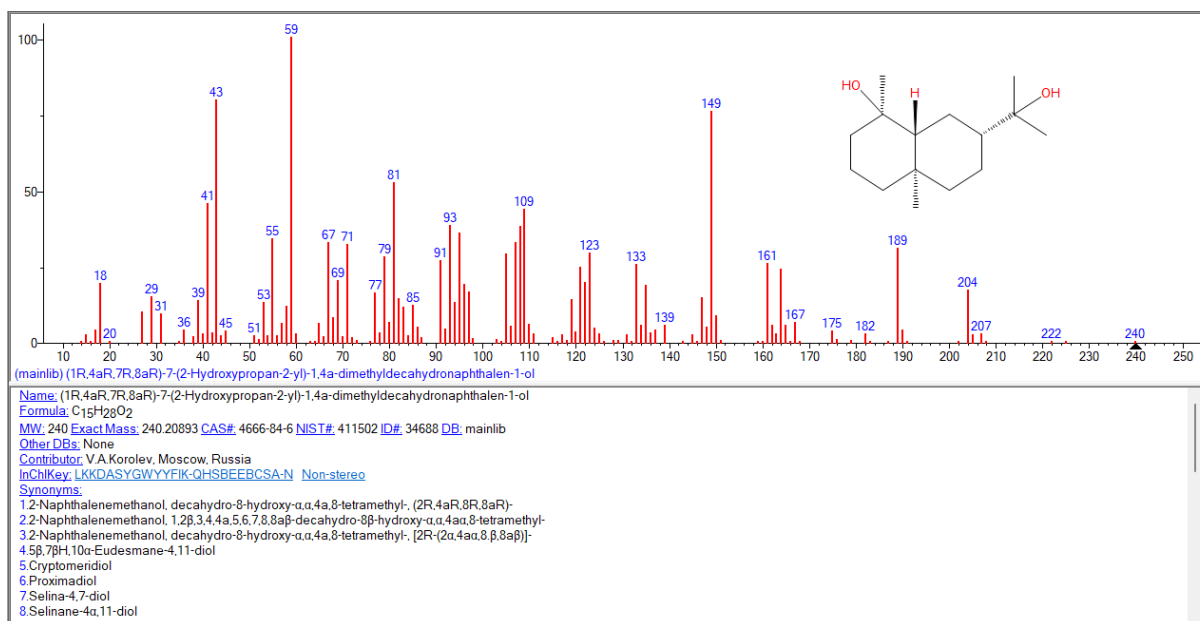


posłużyła się detektorem FID. Do rozdziału została wybrana kolumna niepolarna RTx-1 (Restec). Jest to wybór z jednej strony zastanawiający (Adams posługuje się kolumną typu 5), baza NIST09 posiada również więcej danych na kolumnę typu 5, z drugiej mogę zrozumieć, że posiadana w Instytucie baza Massfinder 4.1 jest wyskalowana na kolumnę niepolarna typu 1. Identyfikacji dokonała Doktoranta porównując rozpad EI-MS (70 eV) z dostępnymi w bazie danych jak również poprzez porównanie indeksów retencji. Jestem przekonany, że duża ilość, szczególnie częściej występujących i bardziej dostępnych komercyjnie substancji była porównywana na podstawie czasu wyjścia wzorców, jednak taka informacja nie znalazła się w przedstawionej mi do oceny dysertacji. Muszę w tym miejscu podkreślić, że identyfikacja składu jakościowego frakcji lotnych szczególnie w obszarze seskwiterpenów/seskwiterpenoidów oraz diterpenów/diterpenoidów bez wzorców często swojego rodzaju kompromisem który każdy badacz olejków musi przyjąć. Część z olejków i frakcji hydrolatów została również przebadana z zastosowaniem metody magnetycznego rezonansu jądrowego, co niewątpliwie podwyższa wartość pracy. Niestety ze względu na ograniczenia ilościowe są to jedynie widma  $^1\text{H}$ .

Analizę przeciwdrobnoustrojową i fitotoksyczność wykonała Doktoranta we współpracy z pro. Beatą Sadowską (Uniwersytet Łódzki) oraz prof. Agnieszka Synowiec (prof. Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie) przy pomocy rutynowych testów.

Moje drobne uwagi i wątpliwości odnoszą się np. do następujących fragmentów:

- a) Wg opisu na str. 66, za masę hydrolatu (po ekstrakcji eterem dietylowym) przyjęto masę związków lotnych, chyba niesłusznie;
- b) literaturowy indeks retencji  $\gamma$ -paczulenu jest wyższy od  $\alpha$ -selinenu, podczas gdy czas wyjścia jest niższy, **Tabela 31** str. 76;
- c) Różnica pomiędzy literaturowym indeksem retencji dla pinanodiolu wynosi 23, czy dobry diastereoizomery został zidentyfikowany?
- d) Czy jest możliwy rozdział o 3 jednostki  $\alpha$ -terpinoeolu i dihydrokarweolu, o tych samych wartościach indeksów retencji (**Tabela 35**)?
- e) Literaturowy RI dla wg bazy NIST20 wynosi 1826 krypromeridiolu. Poniżej przedstawiam też obraz widma masowego krypromeridiolu, wg bazy NIST20:



Widać na nim inny rozkład widma masowego w porównaniu do przedstawionego na **Rys. 15**, str. 98. Być może, Doktorantka zidentyfikowała inny diastereoizomery tego związku? Świadczyć może o tym fakt, iż jeden z diastereoizomerów kryptomeridiolu (obecnych w bazie NIST20, po widmo MS identyczne z do przedstawionego na **Rys. 15** oraz bliższy oznaczonemu indeks retencji;

- Powyższą wątpliwość mogłoby wyjaśnić wykonanie widma <sup>13</sup>C, które jest bardziej jednoznaczne w inetrpretacji;
- Czy rzeczywiście wartość indeksu retencji dla estru metylowego kwasu pin-2-en-8-owego Doktorantka wzięła na podstawie bazy Massfinder czy wcześniejszych doświadczeń Promotora z badań nad tym olejkim?
- Dlaczego szereg substancji, np. eukaliptol nie występuje w olejku eterycznym a jest obecny w hydrolacie (Tabela 39)? Jest to sytuacja na pewno nieoczekiwana i powtarza się niemal w każdej z przedstawianych tabel wielokrotnie ;
- Czy związek nr 16, Tabele 40 to angelian czy może angelikan?
- Przedstawiony chromatogram hydrolatu frackji 1-4 nawłoci później (**Rys. 24**) z w mojej ocenie pokazuje wyższą zawartość cyklokoroneneonu niż frakcie 3 lub 4 co nie koresponduje z wynikami przedstawionymi w **Tabeli 41**.
- Pod tabelą 42 brakuje odnośnika co do wartości literaturowej benzoesanu geranylu;



- l)
- m) Wnoszące więcej informacji porównawczych było by zestawienie w tabelach nie tylko składu procentowego, ale też i składu masowego. Jednocześnie zdaję sobie sprawę w tym miejscu z pracochłonności jakich taka tabela wymagałaby.
- n) Czy dla związku nr 55 (**Rys. 20**) doktorantka wykonała widmo z chemiczną jonizacją dla ustalenia jego masy, jeżeli była taka techniczna możliwość?

Opisane powyższe wątpliwości nie powinny wpłynąć na bardzo pozytywny odbiór ocenianej dysertacji. W mojej ocenie przedstawione w niej wyniki oceniam bardzo dobrze i są wręcz wzorcem do naśladowania przez przyszłych badaczy z obszaru chemii hydrolatów.

### Techniczna i edytorska ocena rozprawy

Przedstawiona dysertacja posiada typową strukturę. Składa się ze 146 numerowanych stron, w skład których wchodzi szereg rysunków (niekiedy dość słabej jakości, np. 7 str. 60). Dysertacja podparta jest bardzo dobrze dobranymi 168 pozycjami literaturowymi. Pierwsza część – *Przegląd literatury* składa się z teoretycznego wstępu, wprowadzającego czytelnika w zagadnienia opisane w dysertacji. Jest to według mojej opinii dobra część pracy. Autorka wprowadziła czytelnika w zagadnienia poruszane w trakcie realizacji pracy doktorskiej. Została opisana tematyka hydrolatów oraz dotychczasowe badanie z obszaru chemii związków lotnych woskowicy, nawłoci hyzopu i cedrzyńca kalifornijskiego. Część *Cel pracy* został zarysowany klarownie, czytelnik nie ma wątpliwości co do zamierzeń, jakie Doktorantka obrała. Część *Przemysłowa Destylacja z Para Wodną* wprowadza czytelnika w mniej znane aspekty otrzymywania olejków na skalę z którą nie na co dzień większość badaczy ma do czynienia. Fragment *Badania Własne – Wyniki i Dyskusja* jest napisany bardzo najlepiej, zwięźle uwypuklając największy sukces badawczy Doktorantki, tj. identyfikację składu i właściwości przeciwdrobnoustrojowych oraz fitotoksycność olejków i hydrolatów. Zauważam bardzo drobne potknięcia, np. str. 122 – wzór limonenu, niekonsekwencję w konwencji przy przedstawianiu stereochemii wzorów, *cis*-werbenolu str. 110 etc. jednak mają one charakter typowo marginalny i nie wpływają na wysoką ocenę tej części dysertacji.



### Wnioski końcowe

Wymienione powyżej drobne uwagi krytyczne i edytorskie niedociągnięcia mają charakter marginalny i nie wpływają na wysoką jakość przedstawionej do recenzji pracy. Bardzo dobrze zaplanowany cel pracy został **zrealizowany**, a przedstawione wyniki nie budzą wątpliwości.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Karoliny Wawrzyńczak posiada **niebagatelną wartość merytoryczną** i zawierając bogaty materiał badawczy i metodologiczny w obszarze chemii hydrolatów.

W mojej opinii dysertacja **spełnia** wszelkie kryteria **ustawowe, ilościowe i jakościowe**, stawiane rozprawom doktorskim i z pełnym przekonaniem składam do Dziekana Wydziału Biotechnologii i Nauk o Żywności Politechniki Łódzkiej Pani dr hab. Anny Diowks, prof. uczelni wniosek o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.