



**Zakład Farmakognozji z Ogrodem Roślin Leczniczych
Katedra Farmakognozji i Botaniki Farmaceutycznej
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

tel./fax +48 81448 7080; e-mail: aludwiczuk@pharmacognosy.org

Lublin, 05.05.2023

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Wawrzyńczak z tytułowanej „**Olejki eteryczne i hydrolaty z wybranych roślin – skład chemiczny i właściwości biologiczne**” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Danuty Kalemby (promotor) oraz dr inż. Agnieszki Krajewskiej (promotor pomocniczy).

Olejki eteryczne i hydrolaty to produkty naturalne, które można otrzymywać z prawie wszystkich części rośliny, czyli liści, kwiatów, kory, nasion, owoców, drewna, kłączy czy korzeni. Ich źródłem mogą być również wydzieliny roślinne (balsamy, żywice). Oba produkty powstają podczas destylacji surowców roślinnych, a ich definicje znajdujemy w normie ISO 9235:2013, która mówi, że olejek eteryczny to produkt otrzymany w wyniku destylacji z parą wodną, wyciskania ze skórek owoców cytrusowych bądź przez suchą destylację. Natomiast hydrolat został zdefiniowany w normie jako wodny destylat/woda aromatyczna, który powstał po destylacji surowca roślinnego z parą wodną i oddzieleniu olejku eterycznego, wtedy gdy jest to możliwe. W ostatnim czasie oba produkty zyskują na znaczeniu, w szczególności jako naturalne zamienniki dla syntetyków powszechnie stosowanych w żywności, farmaceutykach, kosmetykach czy chemii gospodarstwa domowego. Zarówno troska o środowisko, jak i rosnąca liczba odpornych na środki syntetyczne mikroorganizmów, owadów czy chwastów, stwarzają przesłanki do poszukiwania naturalnej alternatywy. Za właściwości i zastosowanie olejków eterycznych jak i hydrolatów odpowiadają związki chemiczne w nich obecne, i to one stały się zasadniczym celem badań podjętych przez Doktorantkę.

Doktorantka podjęła się próby zbadania i opisanie składu chemicznego produktów destylacji z parą wodną, czyli olejków eterycznych i hydrolatów, której to destylacji poddano rośliny zebrane w Polsce. Były to: woskownica europejska (*Myrica gale* L.), hyzop lekarski (*Hyssopus officinalis* L.), cedrzyniec kalifornijski (*Calocedrus decurrens* (Torr.) Florin) oraz dwa gatunki nawłoci, nawłóć kanadyjska (*Solidago canadensis* L.) i nawłóć późna (*Solidago gigantea* Aiton). Zaplanowane eksperymenty obejmowały następujące etapy:

- ustalenie składu chemicznego olejków eterycznych i hydrolatów otrzymanych z liści i kwiatów woskownicy europejskiej oraz ocena ich właściwości przeciwdrobnoustrojowych,
- ustalenie składu chemicznego olejku eterycznego i hydrolatu otrzymanego z ziela hyzopu lekarskiego oraz ocena właściwości fitotoksycznych olejku eterycznego,
- ustalenie składu chemicznego olejku eterycznego i hydrolatu otrzymanego z cetyny (igieł i gałązek) cedrzyńca kalifornijskiego,
- ustalenie składu chemicznego olejków eterycznych i hydrolatów otrzymanych z ziela nawłoci kanadyjskiej i nawłoci późnej,
- porównanie składu chemicznego olejków eterycznych otrzymanych z liści i kwiatów trzech gatunków nawłoci: nawłoci kanadyjskiej, nawłoci pospolitej (*Solidago virgaurea* L.) oraz ich mieszańca, nawłoci *Niederederera* (*Solidago x niederedereri* Khek).

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Całość obejmuje 148 stron i składa się z następujących części. Są to: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wstęp, Przegląd literatury, Cel i zakres badań, Część eksperymentalna, Badania własne – wyniki i dyskusja, Podsumowanie, Spis tabel, Spis rysunków oraz Literatura.

Przegląd literatury Autorka rozpoczęła od rozdziału poświęconego hydrolatom, w którym oprócz rysu historycznego i definicji znajdujemy informacje dotyczące parametrów fizykochemicznych hydrolatów oraz metod analizy ich składu chemicznego, zarówno pod kątem jakościowym jak i ilościowym. Z racji tego, że składnikami hydrolatów są związki lotne, techniką dedykowaną do ich analizy jest chromatografia gazowa. Najłatwiejszą metodą oznaczenia składu jakościowego jak i ilościowego jest bezpośredni nastrzyk próbki hydrolatu do kolumny, jednak z uwagi na niskie stężenie związków w tym produkcie, przed analizą chromatograficzną potrzebne jest odpowiednie zatężenie próbki. Doktorantka opisuje metody izolacji związków lotnych obecnych w hydrolatach, wskazuje również na problemy związane z jakością dostępnych w piśmiennictwie danych dotyczących analizy hydrolatów, co utrudnia porównanie wyników i wyciągnięcie jednoznacznych wniosków. Rozdział o hydrolatach kończy przegląd piśmiennictwa na temat ich właściwości biologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości przeciwdrobnoustrojowych i przeciwutleniających. Dalsza część rozdziału pierwszego to systematyczny opis roślin będących przedmiotem badań eksperymentalnych. Znajdujemy tu opis każdej z roślin, a w szczególności przegląd danych literaturowych dotyczących olejków eterycznych i hydrolatów pozyskiwanych z tych roślin pod kątem różnorodności chemicznej składników w zależności od pochodzenia rośliny oraz ich właściwości biologicznych.

Podsumowując, część teoretyczna stanowi bardzo dobrą, obszerną podstawę do przedstawionych badań i wprowadza czytelnika do celu pracy i metodyki. Dodatkowo należy podkreślić, iż informacje zawarte w tym rozdziale są poparte prawidłowo dobranym piśmiennictwem.

Część doświadczalna recenzowanej pracy składa się z czterech rozdziałów. Są to cel i zakres badań, część eksperymentalna oraz wyniki i dyskusja. Cel pracy i zakres badań zostały jasno i klarownie sformułowane. Na podkreślenie zasługuje fakt współpracy z firmą Biofarm, gdzie na skalę przemysłową otrzymano poddane analizie olejki eteryczne oraz hydrolaty. Część eksperymentalna to zawarty opis materiału roślinnego, który został poddany badaniom oraz aparatury i metod stosowanych do otrzymania (skala laboratoryjna i przemysłowa), izolacji związków lotnych z hydrolatów, analizy składu obu produktów, a także metod badania ich właściwości biologicznych.

W tym miejscu pojawia się kilka pytań:

- W opisie materiału roślinnego (rozdział 3.1; strony 63, 64) w przypadku woskownicy europejskiej Doktorantka, oprócz informacji na temat terminu i miejsca zbioru czy ilości materiału użytego do badań, podaje również dane dotyczące osoby, która zidentyfikowała materiał roślinny oraz numer tzw. 'voucher specimen' czyli egzemplarza referencyjnego zdeponowanego w herbarium. Niestety w przypadku pozostałych substancji roślinnych te dane nie zostały podane. W części teoretycznej pracy Autorka pisze, że podobieństwo morfologiczne między gatunkami nawłoci, w szczególności nawłoci kanadyjskiej i późnej utrudnia ich identyfikację, stąd pytanie o identyfikację, zwłaszcza gatunków nawłoci jest bardzo zasadne. Prawidłowa identyfikacja botaniczna materiału roślinnego to podstawa wszelkich badań nad daną rośliną.
- W opisie metod analizy olejków eterycznych i hydrolatów (rozdział 3.5; strony 66, 67) nie znalazłam informacji o analizie ilościowej. W rozdziale 'Przegląd literatury' na stronie 16 Doktorantka pisze m.in.: „w celu oznaczenia zawartości związków lotnych zwykle stosowano odparowanie rozpuszczalnika po ekstrakcji i zważenie suchej masy lub wykorzystywano analizę GC ekstraktu z heksadekanem jako standardem wewnętrznym.” Pytanie więc, w jaki sposób policzono ogólną zawartość związków lotnych w badanych hydrolatach, oraz w jaki sposób określono procentową zawartość związków obecnych w olejkach eterycznych i hydrolatach po ich analizie metodą GC-FID?
- Dlaczego destylację laboratoryjną cedrzyńca kalifornijskiego prowadzono 5 godzin, podczas gdy w przypadku pozostałych roślin proces trwał 4 godziny?

Wyniki z przeprowadzonych eksperymentów oraz **ich dyskusja** zostały bardzo szczegółowo opisane w rozdziale 4 recenzowanej pracy. Zamieszczone rysunki (18) i tabele (11) ułatwiają interpretację i ocenę otrzymanych wyników.

Doktorantka, roślina po roślinie, omawia i dyskutuje otrzymane wyniki badań eksperymentalnych. W przypadku wyników odnoszących się do olejków eterycznych, na uwagę zasługuje fakt porównania danych z destylacji przemysłowej z destylacją olejków w skali laboratoryjnej, natomiast w przypadku analizy hydrolatów bardzo ciekawie prezentują się wyniki obrazujące zmiany w zawartości i składzie związków lotnych wraz z czasem destylacji.

Przedstawione przez Autorkę wyniki można podsumować następująco:

- Dominującymi składnikami we wszystkich badanych olejkach eterycznych były związki terpenowe, natomiast w OE z woskownicy europejskiej oraz z cedrzyńca kalifornijskiego dominowały węglowodory monoterpenowe, w OE z hyzopu lekarskiego – tlenowe pochodne monoterpenów, natomiast OE z badanych gatunków nawłoci charakteryzowały się głównie obecnością związków seskwiterpenowych. Zaobserwowano niewielkie różnice w zawartości poszczególnych składników olejków eterycznych otrzymanych w skali przemysłowej i laboratoryjnej, wynikające z warunków prowadzenia procesu destylacji.
- Z porównania składu chemicznego olejków eterycznych trzech gatunków nawłoci, nawłoci kanadyjskiej, pospolitej i ich mieszańca, nawłoci Nideredera wynika, że w przypadku nawłoci kanadyjskiej najbardziej charakterystycznymi związkami są germakren D oraz β -turmeron i β -seskwifelandren, zaś nawłoc pospolitą wyróżnia obecność estrów kwasów aromatycznych np. salicylanu benzylu czy benzoesanu geranylu, pomimo że dominującymi związkami są seskwiterpenoidy. Skład chemiczny mieszańca, *Solidago x niederederi* to wypadkowa składu obu wymienionych gatunków.
- Otrzymane podczas destylacji materiału roślinnego z parą wodną hydrolaty charakteryzowały się głównie obecnością tlenowych pochodnych monoterpenów i seskwiterpenów, ze względu na ich większą rozpuszczalność w wodzie w porównaniu do węglowodorów.
- Różnice w składzie chemicznym obu produktów destylacji z parą wodną znajdują swoje odzwierciedlenie w aktywności biologicznej. Różną aktywność przeciwdrobnoustrojową olejków eterycznych i hydrolatów zaprezentowano na przykładzie woskownicy europejskiej. Olejek eteryczny z liści woskownicy był najbardziej aktywny w stosunku do drożdży z rodzaju *Candida*, natomiast hydrolat okazał się aktywny wobec bakterii Gram ujemnych z gatunku *Pseudomonas aeruginosa*.
- Wśród związków lotnych obecnych w hydrolacie hyzopowym zidentyfikowano kryptomeridiol oraz jego epimer, związki do tej pory nieopisane dla hyzopu lekarskiego. Kryptomeridiol został wyizolowany przy użyciu chromatografii faszowej, a jego struktura została potwierdzona metodą $^1\text{H-NMR}$.

Podsumowując należy stwierdzić, iż Doktorantka dobrze zaplanowała badania własne i systematycznie je zrealizowała, a uzyskane wyniki omówione zostały w kontekście aktualnego piśmiennictwa z dziedziny (161 pozycji). Recenzowana dysertacja mgr inż. Karoliny Wawrzyńczak została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest przejrzysto opracowana graficznie. Wszystkie rozdziały dysertacji stanowią spójną całość.

Niestety, przy redagowaniu pracy Autorka nie uniknęła błędów edytorskich, doszukać się można także pewnych nieścisłości, co oczywiście jest nieuniknione, zwłaszcza, że praca liczy sobie prawie 150 stron. W żaden sposób nie wpływa to na wartość pracy, ale z obowiązku recenzenta przytaczam je poniżej:

- Strona 8: Autorka pisze „...oraz cztery gatunki nawłoci” a następnie po dwukropku wymienia tylko dwa, nawłoc kanadyjską i późną.
- Strona 13: Autorka pisze: „... a zawarte w hydrolacie związki organiczne mogą stanowić pożywkę dla drobnoustrojów. Z tego względu niektórzy producenci stosują stabilizatory....”. Fragment ten wymaga komentarza i wyjaśnienia, w szczególności ze względu na najbardziej charakterystyczną dla hydrolatów aktywność przeciwdrobnoustrojową oraz wykorzystanie ich jako naturalnych konserwantów żywności.
- Strona 15: Autorka pisze: „...detektor MS dostarcza zafałszowanych informacji o zawartości związków, o ile nie wykorzystano się do analizy standardów”. Fragment ten wymaga komentarza i wyjaśnienia. Przyjętym standardem jest zastosowanie detektora FID do analizy ilościowej oraz detekcji MS do analizy jakościowej. Wykonanie analizy jakościowej i ilościowej metodą GC-MS nie daje miarodajnych wyników ilościowych, ponieważ detektor MS pracujący w trybie skanowania charakteryzuje się niewystarczającą czułością.
- Strona 19: „...do ekstrakcji hydrolatów stosowano octan etylu, benzen, cykloheksan, etanol i heptan.” Czy na pewno etanol? Jako mieszący się z wodą nie nadaje się do ekstrakcji typu ciec-ciecz.
- Strona 23: Autorka opisując składniki hydrolatów z jednego z gatunków marchwi, *Daucus muricatus* używa określenia gałęzie w odniesieniu do części rośliny z której pozyskany był hydrolat. Marchew nie jest jednak drzewem, więc zamiast pojęcia gałąź powinno być łodyga, tak jak jest to opisane w źródłowym piśmiennictwie.
- Strona 23: „fenylopropany” → powinno być fenylopropanoidy
- Strona 40 i dalsze: nazwy łacińskie rodzin powinny być pisane tekstem normalnym a nie kursywą
- Strona 66: „silikażelem” → powinno być żelem krzemionkowym
- Strona 76, tabela 31: „(E)-β-Karioflen” → powinno być (E)-β-Kariofilen. Ponadto od tabeli 35 Autorka w przypadku tego związku używa nazwy β-kariofilen, bez określenia izomerii przy wiązaniu podwójnym. Nazewnictwo należy ujednoczyć.
- Strona 107, tabela 40: „β-Pinene” → powinno być β-Pinen
- Strona 127: Autorka pisze „Kryptomeridiol..... jest substancją czynną występującą w środku o działaniu przeciwskurczowym, stosowanym w schorzeniach nerek”. Z uwagi na to, że cytowany środek nie jest stosowany w naszym kraju napisałabym raczej, że kryptomeridiol jest związkiem występującym w wielu roślinach należących do rodziny Asteraceae, Cupressaceae, Winteraceae, czy Fabaceae, np. *Blumea balsamifera* oraz *Cymbopogon proximus*. Związek wykazuje działanie przeciwskurczowe i jest stosowany w schorzeniach nerek¹⁶¹.
- Strona 128: zamiast określenia „inhibitował” użyłabym raczej „hamował”

Pragnę podkreślić, iż wartość merytoryczna niniejszej rozprawy doktorskiej jest wysoka. Pani mgr inż. Karolina Wawrzyńczak skutecznie opanowała umiejętność planowania, a następnie sukcesywnej realizacji badań naukowych. Wykazała dobre zrozumienie zagadnień teoretycznych z zakresu tematu, znajomość zastosowanych metod badawczych oraz potrafiła podsumować i krytycznie omówić wyniki własne w odniesieniu do publikacji innych autorów.

Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. Na tej podstawie wnioskuję do Rady ds. Stopni Naukowych Politechniki Łódzkiej, w dyscyplinach nauki chemiczne, inżynieria chemiczna, technologia żywności i żywienia, o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Karoliny Wawrzyńczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A. Ludwiczuk

Dr hab. n. farm. Agnieszka Ludwiczuk, prof. UM