



Dr hab. Piotr Wałejko  
Wydział Chemii  
Uniwersytet w Białymstoku  
ul. K. Ciołkowskiego 1K  
15-245 Białystok

Białystok, 05.09.2023 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej magister Anny Topolewskiej  
*„Opracowanie jednolitej metodyki wyodrębniania, oszacowania i oznaczania glikoalkaloidów  
steroidowych w materiale roślinnym i żywności”*

Uprawianie ziemi jest jedną z podstawowych i zarazem najstarszych form działalności człowieka, związaną z wytwarzaniem żywności, a także niektórych surowców. Obecnie to istotny dział gospodarki światowej, w której istotne znaczenie odgrywa uprawa roślin z rodziny psiankowatych takich jak: ziemniak (*Solanum tuberosum*), pomidor (*Solanum lycopersicum*) oraz bakłażan (*Solanum melongena*). Rośliny psiankowate posiadają szereg walorów smakowych i odżywczych. Są bogatym źródłem węglowodanów, witaminy oraz mikro i makro elementy. Są chętnie spożywane przez ludzi oraz wykorzystywane, jako pasza dla zwierząt lub surowiec w przemyśle farmaceutycznym i przetwórczym. Oprócz wielu cennych składników odżywczych rośliny psiankowate zawierają również związki chroniące rośliny przed atakami szkodników i chorobami. Niestety związki te są trujące w stosunku do ssaków, a należą do ich O-glikozydowe połączenia steroidowych aglikonów z odpowiednimi di-, tri- lub tetra-sacharydami. Głównymi glikoalkaloidami steroidowymi (GA) występującymi w ziemniaku są  $\alpha$ -solanina i  $\alpha$ -chakonina, w pomidorze  $\alpha$ -tomatyna i eskuleozyd A, natomiast w bakłażanach są to solamargina i solasolina. Związki te w różnych ilościach występują we wszystkich organach roślin, przy czym największe ilości GA odnotowujemy w tkankach o wysokiej aktywności biologicznej np. owocach lub niedojrzałych bulwach.

W przypadku produktów spożywczych ustalono, że maksymalny stężenie GA nie powinno przekraczać 200 mg na kg produktu, ale np. w przypadku ziemniaka już ilości powyżej 140 mg na kg sprawiają, że bulwy mają już gorzki smak i mogą powodować problemy żołądkowe. Co prawda niektórzy autorzy sugerują, że w małych ilościach GA mogą być istotnymi komponentami smakowymi i zamachowymi takich bulw. Niestety ilości GA w roślinach psiankowatych są znacznie większe w niedojrzałych roślinach oraz rosną w wyniku uszkodzenia mechanicznego jadalnej części rośliny lub jej ekspozycji na światło. Również zabiegi agrotechnologiczne, np. nawadnianie roślin podnosi poziom GA w roślinach. W skrajnym przypadku w małych młodych owocach pomidora może znajdować się od 300 do 700 mg na kg tomatyny. Podczas gdy dawka ok. 2.8 mg na kg masy ciała wywołuje u człowieka ciężkie objawy zatrucia.

Z uwagi na znaczne wykorzystanie roślin takich jak: ziemniak, pomidor i bakłażan w przemyśle spożywczym oraz ich toksyczność uważam, że recenzowana przeze mnie dysertacja poświęcona została istotnemu problemowi badawczemu. Ponadto pozyskanie zdolności

do szacowania poziomu GA w częściach wegetatywnych roślin pozwoli na ocenę ich zdolności do samoistnej obrony przed infekcjami i owadami żerującymi, co jest istotne z punktu widzenia zrównoważonej gospodarki rolnej. Głównym celem zaplanowanych badań było opracowanie uniwersalnej metody do oznaczania GA z wykorzystaniem mniej kosztocłonnej chromatografii gazowej (GC-MS) w porównaniu do chromatografii HPLC. Realizacja postawionych celów, wydaje się dość trudna, z uwagi na różnorodność wykorzystanego materiału badawczego, którym były zarówno części roślin uprawnych oraz produkty spożywcze.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani Anny Topolewskiej została wykonana w Pracowni Analizy Związków Naturalnych, Katedry Analizy Środowiska, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Gdańskiego, pod kierunkiem dr hab. Łukasza Piotra Halińskiego, prof. UG. Chciałbym podkreślić, że zaproponowany przez Panią Annę temat dysertacji dobrze wpisuje się w tematykę badawczą prowadzoną w Pracowni. Z uwagi na powyższe uważam, że sformułowany przez Autorke cel główny „zaprojektowanie jednolitej metody ekstrakcji i oznaczania glikoalkaloidów steroidowych w materiale roślinnym” jest istotnym problemem odpowiadającym na oczekiwania przemysłu spożywczego, a wykorzystanie w badaniach szerokiego wachlarza technik chromatograficznych takich jak HPLC-UV/VIS i LC-MS/MS oraz GC-FID i GC-MS jest bezsprzecznie mocną stroną recenzowanej pracy.

Praca została przygotowana w tradycyjnej formie i składa się z trzech głównych części: części teoretycznej (28 stron), części eksperymentalnej (14 stron) oraz części zawierającej wyniki i dyskusję (35 stron). Rozprawę poprzedza wykaz skrótów oraz streszczenie w języku polskim i angielskim natomiast na końcu umieszczono podsumowanie i spis cytowanej literatury. W bibliografii cytowano 143 pozycje literaturowe, z czego większość przywołanych w odnośnikach prac oryginalnych została opublikowana na początku bieżącego stulecia, co potwierdza aktualność tematyki dysertacji

W części teoretycznej Autorka przedstawiła podstawowe informacje na temat występowania oraz budowy chemicznej glikoalkaloidów steroidowych obecnych w poszczególnych częściach ziemniaka, pomidora i bakłażana z uwypukleniem zawartości przekraczających dopuszczalny poziom 20 mg/100 g produktu. Omówiona została aktywność biologiczna głównych GA wobec ssaków z uwzględnieniem drogi ich dostarczenia do organizmu jak też najbardziej prawdopodobne szlaki ich biosyntezy w roślinach. Następnie Autorka skupiła się na przedstawieniu opisanych w literaturze sposobów ekstrakcji GA z materiału roślinnego i żywności oraz sposobów oczyszczania i oznaczania poszczególnych glikoalkaloidów. Autorka dobitnie wykazała, że znane metody są dedykowane do różnych typów matryc, co wskazuje na brak ujednoliconej metodologii oznaczania GA. Następnie Autorka po krótko opisuje metody derywatywacji zarówno niezhydrolizowanych GA jak też wolnych aglikonów uwolnionych w wyniku hydrolizy. Całość dopełniają bieżące doniesienia dotyczące metod identyfikacji i oznaczania GA poczynając od najczęściej stosowanych testów immunologicznych oraz spektrometrii mas – głównie MALDI-TOF-MS oraz technik chromatograficznych, takich jak: LC-MS, HPLC-UV/VIS i GC-MS. Z obowiązków wynikających z roli recenzenta poniżej umieściłem przykłady uchybień i niejasności, które zauważyłem w tej części pracy:

1. Uważam, że ta część pracy nabrałaby przejrzystości gdyby Autorka ponumerowała podstawowe GA opisywane w pracy. Moim zdaniem związkom należało nadać numery i umieścić je na oddzielnym czytelnym rysunku. Zabieg ten szczególnie ułatwiłby analizę danych prowadzących do identyfikacji substancji S1, S2 i S3 (np.: str. 66).

2. Rys.1 oraz Tabela 1. Części cukrowe w narysowanych strukturach należy przedstawiać w „wyraźnej” konformacji krzesłowej z jednoznacznym zaznaczeniem wiązań *aksjalnych i ekwatorialnych* - szczególnie jest to istotne w przypadku wiązań glikozydowych (np.: *Molecules* **2023**, 28, 4957).
3. Tabela 1. Umieszczenie dużych struktur w małych komórkach tabeli powoduje, że są one nieczytelne. Podobnie jak numeracja atomów węgla. Wprowadzenie wspomnianej numeracji zawiązków i jej zastosowanie znacznie poprawiłoby czytelność Tabeli 1.
4. Str. 11. Jest: „mogą występować w formie enancjomerów o konfiguracji *R* lub *S* atomów węgla C-22 oraz C-25” – niefortunne sformułowanie, atomy węgla nie mają konfiguracji. Powinno być ... na centrach stereogenicznych.
5. Str. 11. Rysunek 2 wzór 22,26-epiimincholesterolu – w pierścieniu cyklopentanowym niepotrzebnie zaznaczono wiązanie C-H w pozycji C-16, podczas gdy brakuje go przy C-8. Ten sam rysunek – wzór podpisany, jako 3-aminospirostany przy C-3 powinien być podstawnik -NH<sub>2</sub>, a nie -OH.
6. Str. 12. Błędne określenie składu. Chakotrioza to trisacharyd składający się z trzech podjednostek cukrowych – glukozy podstawionej w pozycjach C-2 i C-4 resztami L-ramnozy (Rha(α1-2)[Rha(α1-4)]Glc). W tabeli i tekście jest natomiast D-galaktoza.
7. Str. 13. Zbyt lakoniczne i nieprecyzyjne wyjaśnienie oznaczeń stosowanych dla produktów hydrolizy GA (mamy α-, β<sub>1</sub>-, β<sub>2</sub>- i γ-solaninę czy też α-, β<sub>1</sub>-, β<sub>2</sub>- i γ-cholaninę). Ponadto Tabela 1 nie odnosi się do struktur powstałych w wyniku częściowej hydrolizy GA.
8. W wykazie skrótów, niewłaściwe tłumaczenie akronimów dotyczących spektroskopii NMR. Poszczególne widma NMR różnią się sposobem wzbudzania próbki i typem rejestrowanych danych, a oznaczenia widm (tzw. akronimy), pochodzą od nazwy danej techniki i odnoszą się zwykle do tego, jakie informacje uzyskuje się w danej technice (np. COSY – *ang. Correlation Spectroscopy*, spektroskopia korelacyjna) lub zjawisk fizycznych leżących u podstaw danej techniki (np. NOESY – *ang. Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*). Z uwagi na to akronimy powinien być opisany w następujący sposób: NMR (*ang. Nuclear Magnetic Resonance*) – magnetyczny rezonans jądrowy; HMQC (*ang. Heteronuclear Multiple Quantum Correlation*) – heterojądrowa korelacja wielokwantowa; ROESY (*ang. Rotating-frame nuclear Overhauser effect spectroscopy*) - widmo NOE w rotującym układzie współrzędnych; HSQC (*ang. Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*) - korelacje między jądrami dwóch różnych rodzajów itp. Tak samo akronim UV-VIS – odnosi się raczej do spektroskopii UV-VIS a nie detektora. Podobnie TMSi – to nie pochodna trimetylosililowa tak by było w przypadku TMSi-R, ale reszta lub podstawnik trimetylosililowy.
9. Str. 22. Czy do ekstrakcji GA stosowano metodę ekstrakcji nadkrytycznym CO<sub>2</sub>? Jeśli tak to, z jakim efektem?
10. Str. 28. Jest: „dzięki działaniu sulfotlenku dimetylu, wodoru sodu i jodku metylu...” – Tekst jest niejednoznaczny. Metoda zaproponowana przez S. Hakamori polega na działaniu na sacharyd generowanym *in situ* w reakcji DMSO z NaH tzw. anionem dimetylowym a następnie działaniu odczynnika metylującego (MeI).
11. Str. 30. Należy bardziej podkreślić, że w tym przypadku spektroskopia NMR służy przede wszystkim do określania struktury nowo poznanych GA.

Część eksperymentalną Autorka rozpoczęła od przedstawienia szerokiego spektrum analizowanych próbek, wśród których były: przetworzone produkty spożywcze, świeże owoce i bulwy pomidora, ziemniaka i bakłażana oraz inne ich części. Następnie przedstawiła stosowane procedury przygotowania próbek, z uwzględnieniem etapu ekstrakcji, oczyszczania, hydrolizy oraz derywatywacji wydzielonych glikoalkaloidów. Informacje te z powodzeniem zostały wykorzystane do zoptymalizowania przez Autorkę procesu ekstrakcji GA z wybranych części roślin oraz z żywności. Podobnie po przedstawieniu metodologii analiz GC-FID, GC-MS oraz LC-MS/MS i MALDI-TOF-MS Autorka dokonała optymalizacji warunków derywatywacji GA (TFAA, temp. 75°C, 10 min.) oraz określiła efekty matrycowe obserwowane w technikach GC-MS i LC-MS/MS. Efektywność każdej z technik stosowanych do analizy GA tj. HPLC-UV/VIS, GC-FID, GC-MS i LC-MS/MS określiła na podstawie parametrów walidacyjnych pięciu głównych glikoalkaloidów pomidora, ziemniaka i bakłażana, tj.  $\alpha$ -tomatyny,  $\alpha$ -solaniny,  $\alpha$ -chakoniny,  $\alpha$ -solaniny i  $\alpha$ -solamarginy wyznaczając odpowiednie zakresy stężeń, liniowości i powtarzalności. Uzyskane wartości zostały porównane z uzyskiwanymi z wykorzystaniem uznanej metody oznaczania GA w bulwach ziemniaka (AOAC 997.13). W efekcie bardzo systematycznych badań Autorka wykazała ułomność w analizie GA powszechnie stosowanych technik takich jak HPLC-UV/VIS czy GC-FID przy wyraźnej wyższości technik GC-MS i LC-MS/MS, w których to natomiast obserwowano znaczny efekt matrycowy. Wykorzystując wysoką czułość chromatografii gazowej Autorka wykazała w ekstraktach z liści pomidora obecność, oprócz typowej  $\alpha$ -tomatyny, innych mniej licznych substancji steroidowych. Konkludując mogę stwierdzić, że zgodnie z założeniami wstępnymi w efekcie przeprowadzonych prac opracowano jednolitą metodę ekstrakcji i oznaczania glikoalkaloidów steroidowych (GA) w odniesieniu do wszystkich powszechnie znanych próbek oraz wykazana została wyższość nowej metody w stosunku do oficjalnie uznanej metody AOAC.

Z obowiązków recenzenta uwagi do tej części pracy umieściłem poniżej:

1. Autorka wspomina o chęci opracowania taniej metody oznaczania GA. Moim zdaniem w prac zabrakło informacji o kosztochłonności uznanych metod oznaczania GA, w porównaniu do proponowanej przez Autorkę.
2. Mam uwagi, co do treści tekstu opisującego identyfikację związku S1, S2 i S3. Najpierw pada stwierdzenie, że widmo MS związku S2 jest identyczne z widmem tomatydyny, a S3 z solasodyny, a następnie mamy konkluzję, że dane literaturowe wskazują że S2 to izomer tomatydyny - 22R,25R-soladulcydyna, a S3 to jednak tomatydenol. Brakuje tu precyzyjnego wyjaśnienia, na jakiej podstawie Autorka przypisała uzyskane widma widmo MS konkretnej strukturze.
3. Podobnie wątpliwości mam, co do określenia struktury chemicznej części cukrowej w S1 (lykotetraoza). Chromatogram oraz widma MS uzyskane po derywatywacji, jak też widma MALDI-TOF-MS (jony pseudomolekularne) nie pozwalają jednoznacznie na odrzucenie koncepcji Kazuoke (2023) sugerującej, że nowe glikoalkaloidy steroidowe różnią się stereochemią wiązań glikozydowych w części cukrowej.
4. Czy podjęto próby izolacji dihydrofilotomatyny, która jest głównym składnikiem ekstraktu z liści pomidora *S. pennellii*?
5. Str. 66. Z podpisu umieszczonego pod rysunkiem nie wynika, że uzyskano go dla ekstraktu po hydrolizie i derywatywacji. Czy podejmowano próby derywatywacji niehydrolizowanych glikoalkaloidów (np. metylowanie) i analizy GC-MS?

Pod względem edytorskim praca została przygotowana w sposób staranny, jakkolwiek Autorka nie uniknęła drobnych niedociągnięć. Co do poprawności językowej, to pracę napisano poprawnym językiem, a ilość „literówek” i błędów językowych jest naprawdę niewielka. Oczywiście Autorka nie ustrzegła się całkowicie tego typu błędów, lub niejednoznaczności językowych, co jest zrozumiałe przy przygotowywaniu tak obszernego tekstu. Z obowiązków wynikających z roli recenzenta poniżej umieściłem przykłady takich uchybień.

1. Str. 26. Podanie wzoru  $\text{CCl}_4$  było niepotrzebne.
2. Str. 36. Jest: „użycie spektrometru mas LTQ Orbiter oraz analizom NMR umożliwiło Steinert.” Zdanie sprawia wrażenie niedokończonego.
3. Str. 31. Jest: „połączenie obu wymienionych detektorów (NPD/FID) [119.120] oraz spektrometr mas (MS) [49.50.120].” O jakie połączenie chodzi?
4. Str. 64. W tekście powinno być Rysunek 8, a jest Rysunek 7, podobnie na str. 65 - powinno być: Rysunek 9, a jest Rysunek 8.

Chciałbym jeszcze raz podkreślić, że przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Recenzowana rozprawa udowadnia, że mgr Anna Topolewska posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i krytycznej analizy wyników, a także szukania własnych rozwiązań problemów badawczych.

Wyniki przedstawione w pracy niewątpliwie posiadają elementy nowości naukowej i zostały umieszczone, co najmniej w trzech pracach z sześciu z listy filadelfijskiej, które Autorka ma w swoim dorobku. Niestety pierwszym autorem była jedynie w pracy z 2014 r. w *Journal of Chromatography B* (<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.03.020>). Ponadto Pani Anna ma w swoim dorobku jeszcze cztery prace spoza listy filadelfijskiej związane z tematyką dysertacji. Wyniki prowadzonych badań Autorka zaprezentowała również na licznych konferencjach, w swoim dorobku ma siedem komunikatów ustnych oraz jedenaście komunikatów posterowych.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, a przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Topolewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rich Ustajko