

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

**rozprawy doktorskiej Pana mgr Wojciecha Piotra Ostrowskiego
pt. „Spektrometria mas niskocząsteczkowych związków fenolowych pochodzenia
naturalnego” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Macieja Stobieckiego
w Zakładzie Biochemii Produktów Naturalnych Instytutu Chemii Bioorganicznej w
Poznaniu i Zakładzie Chemii Supramolekularnej UAM.**

Spektrometria mas stała się jednym z podstawowych narzędzi identyfikacji związków organicznych, a stanowiąc element metod sprzężonych w połączeniu z chromatografią gazową, cieczową lub elektroforezą kapilarną rozpowszechniła się w badaniach z zakresu metabolomiki, biologii, chemii związków naturalnych, żywności i innych. Za sprawą miękkich technik techniki jonizacji, głównie elektrorozpylania (ESI) na przestrzeni ostatnich 20 lat obserwuje się gigantyczny postęp w identyfikacji i analizie ilościowej związków biologicznie czynnych metodami LC/MS. Oceniana praca wpisuje się w ten nurt badań.

Przedstawiona do oceny rozprawa ma tradycyjną formę prac doktorskich z podziałem na część teoretyczną (opracowanie literaturowe), część eksperymentalną oraz wyniki i ich omówienie. Całość liczy 147 stron maszynopisu. Opracowanie literaturowe, dość rozbudowane, obejmuje 41 stron i zawiera wstęp poświęcony metabolitom pierwotnym i wtórnym, związkom fenolowym pochodzenia naturalnego – ich budowie, biosyntezie i aktywności biologicznej oraz rozdział poświęcony spektrometrii mas, technikom sprzężonym i bazom danych wykorzystywanych w identyfikacji metabolitów. Rozdział poświęcony związkom fenolowym opisuje podstawowe grupy metabolitów oraz drogi ich biosyntezy, ze szczególnym uwzględnieniem badanych grup związków i napisany jest w sposób bardzo przystępny, dając dużo informacji o niskocząsteczkowych związkach fenolowych. Rozdział poświęcony spektrometrii mas zawiera dużo ogólnych informacji, które można było ograniczyć (np. rodzaje jonizacji inne niż ESI, GC-MS) na rzecz pełniejszego przedstawienia kluczowych dla pracy zagadnień – głównie specyfiki elektrorozpylania. Obszerna część bibliograficzna liczy 237 pozycji.

Wyniki zamieszczone w pracy zostały opublikowane w formie 5 prac w czasopismach z listy JCR: *J. Chromatogr. B.*, *Int. J. Mass Spectrom.*, *Eur. J. Mass Spectrom.* (2) oraz *J.*

Spectroscopy, o IF 0.814 – 2.687, a więc podlegały już procesowi oceny przez recenzentów, a zamieszczenie ich w w/w czasopismach świadczy o ich oryginalności i jakości.

Celem pracy było wykorzystanie różnych wariantów spektrometrii mas do identyfikacji związków fenolowych pochodzenia naturalnego, obejmujących kwasy i aldehydy fenolowe, kurkuminy, dehydrodimery i cyklodimery kwasu ferulowego. Choć te związki te analizowano w większości za pomocą połączenia chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS), przedmiotem pracy są głównie aspekty związane ze spektrometrią mas, w szczególności poświęcone reakcjom fragmentacji i wykorzystaniem różnych trybów pracy analizatorów. Wymienione związki analizowano zarówno w układach modelowych, posługując się czystymi standardami, jak i w ekstraktach roślinnych.

Zaletą wykorzystania ESI w identyfikacji związków organicznych jest łagodna forma tej jonizacji skutkująca wyraźnym jonem molekularnym (pseudomolekularnym) z bardzo nieznaczną fragmentacją. Niestety technika ta nie jest pozbawiona wad. Wśród nich można wymienić zmienność widm w różnych układach faz stosowanych w LC, tworzenie adduktów wpływających na czytelność widm i ich interpretację, czy ograniczenie tej techniki jonizacji do substancji o charakterze polarnym/ionowym znajdujących się w roztworze. Powoduje to konieczność prowadzenia badań podstawowych nad wykorzystaniem tej techniki jonizacji w identyfikacji różnych grup związków, czego praca jest przykładem.

W pracy wykorzystano kilka aparatów wyposażonych w analizatory QToF, pracujących w systemie LC-MS w większości eksperymentów, bądź generując widma poprzez infuzję analitów do komory jonizacyjnej z pominięciem chromatografii. Główny nacisk w pracy położono na interpretację widm masowych posługując się standardami, a także ekstraktami z roślin. Były to ekstrakt z oleju z nasion dzikiej róży (*Rosa canina*), liści łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius*), ścian komórkowych jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*). Poza olejem z nasion róży (zakupionym w sieci handlowej) pozostałe surowce miały dobrze udokumentowane pochodzenie.

Wyniki zamieszczone w pracy podzielono na 4 rozdziały. Pierwsza część wyników (Rozdział 4.1) obejmowała spektrometrię mas kwasów i aldehydów fenolowych, w której wykorzystano standardy analizowanych związków (31), zróżnicowanych zarówno szkieletem, jak i miejscami podstawienia grup funkcyjnych. Do generowania widm tej grupy związków wykorzystuje się głównie jonizację ujemną i taka też była stosowana w niniejszej pracy, chociaż dla ilustracji tego wyboru można było dla kilku związków podać widma w jonizacji dodatniej (jeśli dałoby się je wygenerować) z porównaniem abundancji jonów pseudomolekularnych. W wynikach (Tab. 2) umieszczono czasy retencji oraz wartości m/z obserwowanego jonu pseudomolekularnego $[M-H]^-$ (rejestrowane na aparacie o wysokiej rozdzielczości). Dane te pozwalają na identyfikację badanych aldehydów i kwasów

fenolowych. W przypadku koelucji związków (np. 3 i 15 oraz 11 i 13) są one identyfikowalne poprzez różnice w jonach molekularnych. Dodatkowo pomocne przy identyfikacji są jony fragmentacyjne (Tab. 3).

Szczegółowo przedyskutowano tworzenie adduktów z sodem i potasem i ich potencjalną przydatność diagnostyczną. Przydatne w identyfikacji są głównie jon $[2M-2H+Na]^-$ (sodium bridge dimer) oraz addukt $[3M-2H+K]^-$, które cechuje z reguły duża intensywność. Jak zauważono „...tworzenie klasterów obniża czułość analizy przez zmniejszenie ilości cząsteczek mogących występować jako jon $[M-H]^-$ ”. Interesujące byłoby sprawdzenie warunków pozwalających na zmniejszenie ilości tworzonych adduktów na rzecz zwiększenia intensywności jonu pseudomolekularnego, a także zbadanie zależności intensywności jonów pseudomolekularnych od składu fazy ruchomej, gdzie jak można domniemać efektywność jonizacji będzie wysoce zależna od składu fazy. Wykorzystując MS/MS do identyfikacji kwasu wanilinowego, izowalininowego i 3-metosyalicynowego, o tym samym jonie macierzystym (m/z 167) i jonach potomnych (m/z 152, 123, 108) wykazano zróżnicowanie ich intensywności (Rys. 15) przydatne w identyfikacji, choć w wypadku tych związków identyfikacja w próbkach naturalnych oparta jest bardziej na parametrach retencji, a nie widmach.

Dyskusja dotycząca jonów powstających w procesie ESI dla kwasów i aldehydów fenolowych w niniejszej pracy, odnosi się głównie do aspektów jakościowych. Cennym uzupełnieniem byłoby podanie dla wszystkich analizowanych związków wytycznych do ich analizy ilościowej za pomocą MS/MS z podaniem charakterystycznych przejść MRM i optymalnych energii CID (7 eV dla wszystkich związków?). Pozwoliłoby to na wykorzystanie obok metody LC-HRMS także LC-MS/MS w analizie tych związków w ekstraktach roślinnych. Wyniki omawiane w tym rozdziale były podstawą publikacji w czasopiśmie *Journal of Chromatography B*.

Kompleksy kurkuminoidów z jonami żelaza stały się interesującymi molekułami z uwagi na ich aktywność przeciwnowotworową, większą niż dla samej kurkuminy. W analizie kompleksów kurkuminoidów z jonami żelaza oraz acetyloacetonem metodą ESI/MS, stanowiącej drugą część wyników (Rozdział 4.2), w odróżnieniu od pozostałych eksperymentów nie wykorzystywano połączenia LC-MS, a widma generowano przez bezpośrednie dozowanie analitów do spektrometru mas. Wykazano trzy stechiometrie kompleksów kurkuminy z jonem żelaza (1:1, 2:1, 3:1). Wykazano też, że intensywność jonów o stechiometrii 1:1 zależy od użytej soli żelaza (Fe^{II} lub Fe^{III}) oraz napięcia stożka (CV). W odróżnieniu od kompleksów 1:1, te o stechiometrii 2:1 i 3:1 zawierały wyłącznie żelazo Fe^{III} , nie obserwowano tworzenia jonu $[2Curc-H+Fe^{(II)}]^+$, a jon m/z 790 $[2Curc-H+Fe^{(III)}]^+$ o stechiometrii 2:1 jest najbardziej intensywny i bardzo stabilny (fragmentacja przy 30eV). Dla porównania (z uwagi na β -diketonowy fragment cząsteczki reagujący z jonami żelaza) przeprowadzono eksperymenty z tworzeniem kompleksów przez acetyloaceton z jonami

żelaza otrzymując kompleksy o stechiometrii 1:1, 2:1, 3:1,5:2 i 6:2. Wyniki badań nad kompleksami kurkuminoidów z jonami żelaza i acetyloacetonem były przedmiotem trzech publikacji.

Trzecia część wyników (Rozdział 4.3) poświęcona była identyfikacja dehydrodimerów i cyklodimerów kwasów fenylopropanoidowych metodą HPLC/MS/MS.

Fenylopropanoidy są najprawdopodobniej najbardziej rozpowszechnionymi metabolitami powstającymi na szlaku kwasu szikimowego. O ile łańcuch C3 może ulegać różnym modyfikacjom, większość metabolitów to kwasy i ich pochodne. Wśród tych związków kwas p-hydroksycynamonowy (p-kumarowy) przyciąga szczególną uwagę ze względu na właściwości fungistatyczne i prozdrowotne oraz przeciwutleniające. W ścianach komórkowych kwasy te są związane w postaci złożonych kompleksów, głównie z polisacharydami. Kwasy fenylopropanoidowe mają także zdolność do tworzenia dehydrodimerów, najczęściej wskutek obecności reaktywnych form tlenu w ścianach komórkowych w wyniku reakcji fotochemicznej cykloaddycji. Wynikiem tej reakcji jest zazwyczaj synteza kilku izomerów. Obok udziału tych związków w metabolizmie drugorzędowym roślin pojawiają się także doniesienia o potencjalnym wykorzystaniu dimerów kwasu ferulowego i kawowego jako substancji w leczeniu między innymi choroby Alzheimera. Z punktu widzenia metabolomiki to także istotna grupa związków.

Autor badał dehydrodimery i cyklodimery kwasów fenylopropanoidowych w ścianach komórkowych liści jęczmienia zwyczajnego, za pomocą tandemowej spektrometrii mas (MS/MS) opracowując drogi fragmentacji w oparciu o widma CID MS/MS. Istnieją także metody badania kwasów fenylopropanoidowych za pomocą połączenia chromatografii gazowej ze spektrometrią mas po reakcji silylacji, problemem zazwyczaj jest możliwość izomeryzacji i niestabilność pochodnych TMS. Niewątpliwie LC/MS/MS ma w tym względzie więcej zalet jako wiarygodna metoda analizy struktury tych związków co autor wykazał.

Chociaż podobne badania nad dimerami kwasów fenylopropanoidowych były prowadzone wcześniej z wykorzystaniem LC-MS/MS (np. dla związków obecnych w ścianach komórkowych łodyg i liści pszenicy, Callipo i in., 2010, cytowani przez autora) to eksperymenty autora nad identyfikacją dimerów w ścianach komórkowych liści jęczmienia zwyczajnego po hydrolizie zasadowej mają charakter nowatorski. Autorowi udało się zidentyfikować 15 związków w oparciu o eksperymenty CID MS/MS między innymi trzy dimery cyklobutanowe kwasu ferulowego i 6 jego dehydrodimerów. Badania opisane w tym rozdziale pracy były przedmiotem publikacji w czasopiśmie *International Journal of Mass Spectrometry*. Autor podał szczegółowe drogi fragmentacji dla pochodnych kwasu truksylowego i truksynowego, kwasu 8-O-4'-diferulowego (a także 8,8', 8,5', 5,5') a także dehydrodimeru kwasu kumarowego i sinapowego. Niewątpliwie wyniki tego rozdziału pracy pogłębiają wiedzę na temat metabolomu jęczmienia, szczególnie komponentów ścian komórkowych i ich możliwych reakcji na stresy biotyczne i abiotyczne.

Badane pochodne kwasu kumarowego i ferulowego w stosowanym układzie chromatograficznym dla niektórych dehydrodimerów i cyklodimerów miały takie same czasy retencji co skutkowało koniecznością odpowiedniego doboru unikalnych jonów potomnych dla koeluujących związków. Koeluowały z sobą jeden z izomerów kwasu ferulowego i jego dimer cyklobutanowy oraz izomer kwasu ferulowego, dimer cyklobutanowy i dehydrodimer – co sugeruje bardzo małe zróżnicowanie powinowactwa w/w związków do fazy ruchomej i stacjonarnej. Nie jest to zaskakujące dla dehydrodimerów i cyklodimerów, natomiast wydawałoby się, że czasy retencji kwasów powinny się wyraźnie różnić od ich dimerów. Dopracowanie warunków chromatograficznych ułatwiłoby znacznie identyfikację tych związków za pomocą spektrometrii mas.

Ostatnia część wyników obejmuje (Rozdział 4.4) wykorzystanie spektrometrii mobilności jonów (IMS) do rozdziału jonów izobarycznych. Segregacja jonów w komorze dryftu IMS oparta jest na różnym współczynniku ruchliwości jonów (który zależy od ich masy, ładunku i różnicy przekroju czynnego jonów) przyspieszanych w polu elektrycznym w tubie wypełnionej gazem buforowym. Choć spektrometry ruchliwości jonów istnieją jako samodzielne urządzenia, w systemach LC-MS wykorzystywane są od niedawna jako osobna sekcja spektrometru. Pozwala ona na uzyskanie dodatkowego elementu różnicującego związki koeluujące na wylocie kolumny chromatograficznej. Aparat wyposażony w IMS wykorzystano do rozdziału cyklodimerów i dehydrodimerów kwasów fenylopropanoidowych, które sprawiały trudności w separacji w poprzednich doświadczeniach.

Dla związków koeluujących w tym samym czasie (związek 49 i 50) zaobserwowano różnice w czasie dryftu 1ms, choć przedstawione na rysunku 55 czasy dryftu dla jonów tych związków nie korespondują z tymi, zamieszczonymi w tabeli 7. Dla niektórych koelucji (związek 51 i 52) udało się uzyskać znaczną różnicę w czasie dryftu, aczkolwiek związki te wykazywały minimalne różnice w czasie retencji (0.1min). szczegółowo przedyskutowano tworzenie adduktów dla zidentyfikowanych czterech dimerów cyklobutanowych kwasu ferulowego, czterech dehydrodimerów kwasu ferulowego uwzględniając specyfikę budowy cząsteczek.

Wykazano, że stosując technikę IMS można poprawić jakość widm dla koeluujących związków. Otwarte natomiast pozostaje pytanie, czy nie można podobnych efektów uzyskać dobierając odpowiednie warunki rozdziału związków na kolumnie chromatograficznej.

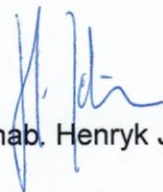
Ocena końcowa pracy

Rozprawę doktorską pana mgr Wojciecha Ostrowskiego oceniam jako bardzo wartościową i wnoszącą dużo cennych informacji zarówno w obszarze spektrometrii mas związków naturalnych, odnoszących się do specyfiki jonizacji ESI w analityce związków fenolowych, jak i w obszarze wiedzy o metabolomie roślin (głównie jeśli chodzi o ekstrakty liści łubinu wąskolistnego i ścian komórkowych jęczmienia zwyczajnego). Wyniki pracy

wnoszą bardzo dużo informacji związanych z drogami fragmentacji analizowanych związków, co stanowi o jej wartości.

Pan mgr Wojciech Ostrowski wykazał się bardzo dobrą znajomością spektrometrii mas, głównie w obszarze identyfikacji związków w oparciu o eksperymenty MS/MS i mechanizmów fragmentacji, a także wykorzystał w badaniach skomplikowaną aparaturę (spektrometry typu QToF, IMS-QToF) do tych celów. Opublikowane prace, w czasopismach o ustalonej renomie w obszarze technik chromatograficznych i spektralnych, są dodatkowym dowodem wysokiej jakości prowadzonych badań.

Stwierdzam, że oceniana przez mnie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie pana mgr Wojciecha Ostrowskiego do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.



Prof. dr hab. Henryk Jeleń