



## Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach

---

prof. dr hab. inż. Barbara Gawdzik  
Instytut Chemii  
Wydział Nauk Ścisłych i Przyrodniczych  
ul. Uniwersytecka 7  
25-406 Kielce  
b.gawdzik@ujk.edu.pl

Kielce 17.02.2025

**Ocena Pracy doktorskiej Pani mgr Joanny Andrusiak**  
pt. „Opracowanie efektywnej metody syntezy ksantohumolu,  
badanie jego właściwości i enkapsulacja”

Podstawę opracowania stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, odnośnie powierzenia mi funkcji recenzenta rozprawy doktorskiej mgr Joanny Andrusiak pt. „Opracowanie efektywnej metody syntezy ksantohumolu, badanie jego właściwości i enkapsulacji”.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska mgr Joanny Andrusiak wykonana pod kierunkiem Profesora Jacka Ścianowskiego oraz doktora Marcina Budnego jako opiekuna z ramienia przedsiębiorstwa Synthex Technologies Sp. z o.o. dotyczy opracowania strategii syntezy ksantohumolu i zbadania jego właściwości pod kątem zwiększenia stabilności chemicznej poprzez kompleksowanie w  $\gamma$ -cyklodekstrynie.

Tematyka dysertacji doktorskiej wpisuje się w aktualny nurt badań nad poszukiwaniem nowych efektywnych metod otrzymywania i optymalizacji standardowych procesów syntezy strukturalnych analogów naturalnych połączeń, charakteryzujących się wielokierunkową aktywnością biologiczną. Ponadto chalkonowe pochodne, o potwierdzonej badaniami aktywności farmakologicznej: przeciwbakteryjnej, przeciwgrzybiczej, przeciwwirusowej, przeciwzapalnej

i przeciwnowotworowej, do których zalicza się tytułowy ksantohumol, stanowią cenny surowiec dla przemysłu farmaceutycznego, kosmetycznego oraz spożywczego. Z uwagi na powyższe podjęta przez Panią mgr Joannę Andrusiak tematyka badań jest w pełni uzasadniona.

Recenzowana praca doktorska o charakterze monograficznym liczy 116 stron a zgodnie z przyjętymi standardami została podzielona zasadniczo na dwie części: literaturową i doświadczalną. W rozprawie znalazły się liczne schematy reakcji oraz rysunki, na których przedstawiono struktury cytowanych w tekście pracy związków, a także tabele zawierające liczbowe dane eksperymentalne. Przed częścią literaturową zostały zamieszczone: streszczenia w języku polskim i angielskim oraz wykaz skrótów. Aczkolwiek nie wszystkie stosowane w tekście pracy skróty w tym spisie zostały uwzględnione (np. AIBN, mCPBA czy Boc). Część literaturową poprzedza wstęp, w którym po krótkim zestawianiu farmakologicznych właściwości chalkonów prenylowych, których przedstawicielem jest ksantohumol, został przedstawiony cel pracy wraz z esencjonalnym uzasadnieniem, sugerującym realizację badań w ramach doktoratu wdrożeniowego w przedsiębiorstwie Synthex Technologies Sp. z o.o..

Część literaturową Autorka pracy doktorskiej rozpoczyna od przedstawienia struktur chalkonów prenylowych i flawonów obecnych w szyszkach chmielu oraz ogólnych informacji na temat naturalnych źródeł ksantohumolu, by w następnym podrozdziale zaprezentować jego biosyntezę. W kolejnym podrozdziale tej części Doktorantka przedstawiła pięć opisanych w literaturze wieloetapowych procesów otrzymywania ksantohumolu, w tym bardziej szczegółowo opisała syntezę ksantohumolu znakowanego izotopem węgla  $^{13}\text{C}$ .

Z dużym zainteresowaniem przeczytałam podrozdział poświęcony aktywności biologicznej ksantohumolu. Szkoda, że Autorka pracy zakończyła go jednym lakonicznym zdaniem na temat „rosnącego zainteresowania ksantohumolem, jako składnikiem suplementów diety i preparatów kosmetycznych”, bo przecież ten podrozdział wskazuje na inspirację tematyką badawczą rozprawy doktorskiej i doskonale uzasadnia jej wybór.

Najobszerniejszym podrozdziałem Części literaturowej jest podrozdział, w którym Doktorantka przedstawiła metody otrzymywania związków aromatycznych zawierających w swej strukturze podstawnik prenylowy,

z wykorzystaniem reakcji [3,3]-sigmatropowego przegrupowania eterów prenylowo-arylowych z udziałem różnego typu katalizatorów oraz reakcji nukleofilowego podstawienia chlorowcoprenylowych pochodnych (głównie bromku prenylu) z zastosowaniem związków metaloorganicznych: magnezu, litu, cyny, indu, miedzi czy palladu.

Kończąc Część literaturową Doktorantka wyjątkowo lakonicznie potraktowała „Chemię związków makrocyklicznych”, taki tytuł nosi podrozdział dotyczący cyklodekstryn, jednej z wielu grup połączeń określanych mianem związków makrocyklicznych. Z powyższych względów uważam, że ten podrozdział powinien być zatytułowany, adekwatnie do zakresu zawartych w nim informacji.

Przechodząc do uwag dotyczących tej części dysertacji doktorskiej, chciałabym zwrócić uwagę na pewne niedociągnięcia, do których zaliczam stosowanie kolokwializmów takich jak: „kłopotliwe rozpuszczalniki” (strona 25) lub personalizacja substratów reakcji przez określanie ich mianem „partnerów” (strona 20). Podczas publicznej obrony proszę o zdefiniowanie „termicznego przegrupowania Claisena” (strona 16). Na Schemacie 8 (strona 21) ilustrującym kondensację Claisena-Schmidta nie przypisanie numeru 41 dla aldehydu sugeruje, że zastosowanie dowolnego aldehydu prowadzi do otrzymywania znakowanego izotopowo ksantohumolu  $^{13}\text{C}$ -1. Pisząc o możliwości zastąpienia *N,N*-dietyolaniliny w reakcji przegrupowania Claisena (Schemat 12, strona 25) należałoby podać czym można ją zastąpić, a jeśli w treści pracy jest mowa o zastosowaniu reakcji Mitsunobu w syntezie produktów naturalnych, to brak zacytowania odpowiedniej literatury budzi wątpliwości, czy jest to możliwe. Z kolei ujednolicenie nazewnictwa związków (np. chlorek metoksymetylowy (MOMCl) w wykazie skrótów to eter chlorometylowometylowy) oraz ograniczenie nadmiernego stosowania skrótów takich jak np. [3,3]-Claisen lub [3,3]-Cope (Schemat 16, strona 27) ułatwiłoby w mojej opinii lekturę pracy doktorskiej.

Podsumowując Część literaturową, uważam, że Pani magister Joanna Andrusiak przedstawiała w niej najbardziej istotne zagadnienia, stanowiące tło problemów związanych bezpośrednio z badaniami wpisanymi w rozprawę doktorską. Pragnę podkreślić, że 104 pozycje literaturowe, na podstawie których

zredagowana została Część literaturowa, dobrane są prawidłowo i dobrze wprowadzają czytelnika w tematykę realizowanych badań.

Część poświęconą omówieniu badań własnych zatytułowaną „Wyniki i dyskusja” rozpoczyna rozdział, w którym Pani mgr Joanna Andrusiak konkretnie i zadaniowo sprecyzowała cele pracy, którymi były:

- opracowanie i optymalizacja procesu syntezy ksantohumolu,
- otrzymanie stabilnych kompleksów ksantohumolu poprzez enkapsulację w  $\gamma$ -cyklodekstrynie,
- synteza deuterowanego analogu ksantohumolu, jako wzorca wewnętrznego do oznaczania stabilności i zawartości ksantohumolu w produktach spożywczych,
- wdrożenie opracowanych strategii otrzymywania ksantohumolu i jego analogów strukturalnych na skalę przemysłową.

Realizację zaplanowanych celów pracy Doktorantka rozpoczęła od otrzymania ksantohumolu zgodnie z opisaną w literaturze procedurą. W wyniku przeprowadzonych kolejno: reakcji acylowania metodą Friedela-Craftsa, zablokowania dwóch z trzech grup hydroksylowych pochodnej floroglucynolowej, reakcji Williamsona, przegrupowania Claisena, O-metylowania, kondensacji Claisena-Schmidta i hydrolizy w środowisku kwaśnym otrzymała tytułowy ksantohumol, z wydajnością nieco niższą od najwyższej wydajności podanej w literaturze. Liczne próby modyfikacji ośmioetapowej metody otrzymywania ksantohumolu, które polegały na zmianie kolejności etapów lub zastąpieniu wyjściowego 1,3,5-trihydroksybenzenu O-alkoksyłowymi pochodnymi benzenu: 1,3,5-trimetoksybenzenem i 1,3,5-tribenzylloksybenzenem, a także na zastąpieniu 2-acylo-3,5-dimetoksyfenolu jego 3,5-dibenzoksy pochodną, a które na etapie przegrupowania Claisena, czy na etapie usuwania grup zabezpieczających, Doktorantka prowadziła w różnych warunkach temperaturowych z zastosowaniem różnego typu reagentów i w różnych rozpuszczalnikach, pomimo ogromnego nakładu pracy i determinacji zakończyły się niepowodzeniem. W następnym etapie badań zostały podjęte próby otrzymania ksantohumolu z wykorzystaniem reakcji sprzęgania Suzuki-Miyaura. Doktorantka na kolejnych stronach opisała próby przeprowadzenia

dibenzoksylowej pochodnej bromo- i jodorezorcynolu w odpowiedni ester pinakolowy i kwas boronowy. Tylko w przypadku reakcji z udziałem bromopochodnej zawierającej w swej strukturze w pozycjach *orto* dwie grupy benzyloksylowe udało się otrzymać oczekiwany kwas dibenzyloksyboronowy, który następnie został przeprowadzony w pochodną dibenzyloksy prenylową. Podczas obrony proszę o wyjaśnienie celowości syntezy prenylowej pochodnej **172**, w której strukturze brak podstawnika metoksylowego.

Kolejnym etapem badań, których wyniki Pani mgr. Joanna Andrusiak przedstawiła w swojej dysertacji było zmodyfikowanie znanej z literatury sześćoetapowej metody otrzymywania ksantohumolu z zastosowaniem naringeniny, w roli wyjściowego substratu. Należy podkreślić, że optymalizacja [3,3]-sigmatropowego przegrupowania Claisena, polegająca na doborze ilości katalizatora i czasu prowadzenia reakcji, jak również zoptymalizowania reakcji O-metylowania pod kątem ilości reagentów: jodku metylu ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) i tlenku srebra ( $\text{Ag}_2\text{O}$ ) umożliwiła otrzymanie ksantohumolu i jego deuterowanego analogu z wyższymi wydajnościami w stosunku do wartości podawanych w literaturze. Uzasadnieniem syntezy deuterowanego analogu ksantohumolu, było przetestowanie go jako wzorca wewnętrznego w oznaczaniu stabilnego rozcieńczenia izotopowego.

Ostatnim etapem badań opisanych w dysertacji doktorskiej w części zatytułowanej „Wyniki i dyskusja” było zbadanie wpływu enkapsulacji ksantohumolu w  $\gamma$ -cyklodekstrynie na zwiększenie stabilności aktywności antyutleniającej ksantohumolu.

Przechodząc do uwag dotyczących tej części rozprawy doktorskiej pragnę zwrócić uwagę, że nie do końca zrozumiałym jest dla mnie cel przeprowadzenia czteroetapowego procesu syntezy dostępnego komercyjnie metoksyrezorcynolu (**154**). Mylącym pozostaje fakt, że na Schematach reakcji (Schemat 47 na stronie, Schemat 51 na stronie 58, Schemat w Tabeli 5 na stronie 50 i Schemat w Tabeli 11 na stronie 64) nie zaznaczono tych reakcji, które nie prowadziły do otrzymania spodziewanych produktów lub związków, które nie znalazły się wśród zsyntezowanych pochodnych. O braku sukcesu syntetycznego czytelnik dowiaduje się dopiero po przeczytaniu komentarza dotyczącego danej reakcji. Poza tym ze Schematu 49 jednoznacznie wynika, że substratem dla obu reakcji Suzuki-Miyaura jest prenylowa pochodna

metoksyrezorcynolu, która w tekście pracy została przedstawiona jako finalny produkt obu reakcji retrosyntezy. Z opisu reakcji Grignarda tribenzoksy bromopochodnej zawierającej w pierścieniu aromatycznym podstawnik prenylowy zilustrowanej na Schemacie 46 (strona 52) wynika, że produktem była mieszanina dwóch tribenzoksy prenylowych aromatycznych pochodnych z grupą acylową i bez podstawnika acylowego. O tym jakie były dalsze losy otrzymanej mieszaniny chciałabym usłyszeć podczas obrony rozprawy doktorskiej. Pragnę zauważyć, że rezorcynolowi oraz jego bromopochodnej na stronie 59 przy opisie reakcji przedstawionej na Schemacie 54 przypisano błędną numerację.

Uzyskane podczas realizacji badań wyniki Autorka pracy zaprezentowała w rozdziale zatytułowanym „Podsumowanie”.

Ostatnia część dysertacji doktorskiej to „Część eksperymentalna”, w której wymienione zostały metody spektroskopowe zastosowane dla określenia budowy zsyntezowanych połączeń organicznych oraz wykorzystana w tym celu aparatura. Ponadto została opisana szczegółowa preparatyka przeprowadzanych syntez oraz wymienione zastosowane w nich komercyjne odczynniki chemiczne. W tej części zabrakło mi konsekwencji w przedstawieniu kompletnych danych spektroskopowych. Pomimo, że Autorka podkreśla fakt wykonania widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, IR oraz analizy elementarnej, to tylko dla ośmiu otrzymanych związków zamieściła wyniki analizy IR,  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR, natomiast nie znalazłam danych właściwych dla analizy elementarnej. Pozostając w temacie analizy spektroskopowej, w przypadku charakterystyki kilku pochodnych fenolowych nie zostały podane sygnały generowane przez protony grup hydroksylowych. Żałuję również, że tylko dla tytułowego ksnatohumolu Doktorantka uznała za właściwe załączenie kompletu widm  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR i chromatogramu HPLC.

Dla mnie jako recenzenta istotne uzupełnienie tematyki badawczej i prowadzonych przez Panią mgr Joannę Andrusiak w ramach realizacji doktoratu wdrożeniowego prac naukowo-badawczych, stanowi zamieszczony wykaz dorobku naukowego, na który składają się: trzy publikacje w renomowanych czasopismach naukowych, trzy patenty oraz dwie prezentacje posterowe na konferencji krajowej.

Przystępując do oceny wartości merytorycznej pracy doktorskiej stwierdzam, że Pani mgr Joanna Andrusiak wykonała postawione przed Nią zadania i zrealizowała cele pracy. Do najważniejszych osiągnięć niewątpliwie należy zaliczyć:

- otrzymanie ksantohumolu i jego deuterowanego analogu zgodnie z opracowanym i zoptymalizowanym sześćoetapowym procesem z wydajnością wyższą niż wydajność uzyskana w przypadku zastosowania metody opisanej w literaturze,
- opracowanie analitycznej metody HPLC-MS/MS do oznaczania ksantohumolu w piwie metodą rozcieńczenia izotopowego z zastosowaniem deuterowanego ksantohumolu w roli wewnętrznego wzorca,
- zwiększenie stabilności oraz aktywności antyoksydacyjnej ksantohumolu poprzez enkapsulację w  $\gamma$ -cyklodekstrynie.

Pomimo pewnych niedociągnięć i usterek natury stylistycznej, gramatycznej i edytorskiej oraz przedstawionych w treści recenzji uwag, wynikających z powierzonej mi roli recenzenta pragnę podkreślić, że tematyka prowadzonych w ramach dysertacji doktorskiej badań jest ważna i ciekawa. Uzyskane wyniki, które częściowo zostały opublikowane, a zatem spotkały się z uznaniem w redakcjach i opiniach recenzentów, niezaprzeczalnie mają wartość poznawczą i aplikacyjną dla obszaru syntezy organicznej, a w szczególności syntezy związków biologicznie aktywnych i ich oznaczania w produktach spożywczych.

Reasumując, po zapoznaniu się z zakresem i wynikami badań wpisanych w realizację celów pracy doktorskiej stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska autorstwa Pani mgr Joanny Andrusiak pod tytułem „Opracowanie efektywnej metody syntezy ksantohumolu, badanie jego właściwości i enkapsulacja” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 190 ust. 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. zm.). W związku z powyższym przedstawiam Radzie Naukowej Dyscypliny Nauki Chemicznej Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu wniosek o dopuszczenie Pani mgr Joanny Andrusiak do dalszych etapów obrony pracy doktorskiej.

*hab. prof. dr hab. inż. Andrzej Czerwinski*