



**Samodzielna Pracownia  
Chemii Produktów Pochodzenia Naturalnego  
Katedra i Zakład Farmakognozi  
UNIwersytet Medyczny w Lublinie**

ul. Chodźki 1, 20-093 LUBLIN

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

---

Lublin, 12.03.2021

**RECENZJA**

rozprawy na stopień doktora w dyscyplinie technologia żywności i żywienia **mgr inż. Klaudii Anny Kałwa** zatytułowanej „**Ocena przydatności glicerolu do ekstrakcji wybranych substancji biologicznie czynnych w aspekcie wytwarzania płynnych suplementów diety**” wykonanej pod kierunkiem dr hab. Radosława Kowalskiego, profesora uczelni (promotor) oraz dr Artura Mazurka (promotor pomocniczy) w Katedrze Analizy i Oceny Jakości Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Glicerol, znany również pod nazwą gliceryna, to organiczny związek chemiczny z grupy cukroli. Jest składnikiem wielu produktów jakie znajdziemy na półkach w drogeriach, sklepach spożywczych czy aptekach. Jako dodatek do żywności występuje po kodem E422. Gliceryna może być pochodzenia roślinnego (otrzymywana na drodze reakcji zmydlania tłuszczów zazwyczaj z tłuszczu palmowego, oleju kokosowego czy z nasion soi) lub syntetycznego (otrzymywana poprzez utlenianie propylenu lub jako produkt uboczny produkcji biopaliw). Szerokie zastosowanie gliceryny wynika z jej właściwości. Jako alkohol wielowodorotlenowy jest substancją polarną, dobrze rozpuszczalną w wodzie. Jest dobrym rozpuszczalnikiem nie tylko dla substancji polarnych, ale również niepolarnych np. tłuszczy. Posiada też właściwości higroskopijne, czyli wiąże cząsteczki wody. W niskich stężeniach wykazuje więc właściwości nawilżające, w wysokich natomiast (powyżej 25%) działa odkażająco i wysuszająco. Ponadto wiążąc wodę ogranicza wzrost drobnoustrojów, a więc ma właściwości konserwujące. Gliceryna uważana jest za substancję nietoksyczną, nie mniej jednak należy pamiętać, że zażywanie jej przez cukrzyków, osoby z niewydolnością nerek i chorobami serca powinno być konsultowane z lekarzem, ze względu na ryzyko odwodnienia.

Tak ciekawe właściwości glicerolu oraz jego szerokie zastosowanie skłoniło Doktorantkę do wykorzystania tego rozpuszczalnika jako ekstrahenta związków biologicznie czynnych obecnych w roślinach leczniczych, w aspekcie wytwarzania płynnych suplementów diety. Z przeglądu piśmiennictwa przedstawionego przez Doktorantkę wynika, że glicerol nie należy

do popularnych ekstrahentów, pomimo tego, że jest uważany za 'zielony rozpuszczalnik' wpisujący się w trend zrównoważonego rozwoju technologii chemicznej.

Zasadniczym celem recenzowanej rozprawy doktorskiej była więc ocena możliwości wykorzystania układów glicerolowo-wodnych do pozyskania ekstraktów z czterech roślin leczniczych. Badaniom poddano tymianek pospolity (*Thymus vulgaris* L.), miętę pieprzową (*Mentha x piperita* L.), czystek siwy (*Cistus x incanus* L.) oraz hyzop lekarski (*Hyssopus officinalis* L.). Zaplanowane eksperymenty obejmowały następujące etapy:

- ustalenie warunków granicznych dla prowadzenia ekstrakcji (czas i temperatura ekstrakcji)
- ocena stężenia polifenoli, flawonoidów oraz frakcji lotnej w otrzymanych ekstraktach
- ekstrakcja materiału poekstrakcyjnego
- porównanie uzyskanych danych dla ekstraktów glicerolowo-wodnych z ekstraktami otrzymanymi przy użyciu wody, 50% etanolu oraz oleju roślinnego.

Recenzowana monografia posiada układ typowy dla prac o charakterze eksperymentalnym. Całość obejmuje 215 stron i składa się z następujących części. Są to: Streszczenia w języku polskim i angielskim, Wprowadzenie, Przegląd piśmiennictwa, Cel pracy, Materiały i metody, Wyniki i omówienie, Podsumowanie, Wnioski, Bibliografia, Spis rysunków oraz Spis tabel.

Przegląd piśmiennictwa stanowiący rozdział II rozprawy, oprócz informacji dotyczących glicerolu i wykorzystania tego rozpuszczalnika do ekstrakcji związków biologicznie czynnych, zawiera również opis najważniejszych metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym. Doktorantka opisuje także metody ekstrakcji związków fenolowych oraz frakcji lotnej, które to grupy metabolitów roślinnych były przedmiotem szczegółowych eksperymentów. W tym miejscu muszę zatrzymać się na frakcji lotnej, która przez Autorkę nazywana jest olejkami eterycznymi. Z definicji olejku eterycznego, która jest podana na stronie 24 monografii wynika, że „olejki eteryczne stanowią produkty otrzymywane/pozyskiwane z różnych części surowców roślinnych (kwiaty, liście, korzenie, nasiona, owoce, etc.) za pośrednictwem destylacji z parą wodną, wyciskania ze skórek owoców cytrusowych bądź przez suchą destylację”. Jak wynika z tej definicji, olejkami eterycznymi nie są produkty otrzymywane wszystkimi innymi metodami. Olejkami eterycznymi nie można więc nazwać produktu otrzymanego z materiału roślinnego w wyniku jego ekstrakcji rozpuszczalnikiem, np. heksanem, alkoholem, tłuszczem, czy też ekstraktu otrzymanego przy pomocy ciekłego dwutlenku węgla. Olejkami eterycznymi nie są więc konkrety, pomady, absoluty, tinktury, a także inne ekstrakty otrzymane przy użyciu różnych nowoczesnych technik ekstrakcyjnych (m.in. SFE – ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym, ASE – przyspieszona ekstrakcja rozpuszczalnikowa, UAE – ekstrakcja wspomaganą ultradźwiękami). Idąc dalej, ponieważ olejek eteryczny to produkt, a więc nie występuje on w materiale roślinnym, należy go z niego otrzymać przy użyciu przewidzianych definicją metod. W materiale roślinnym znajdują się metabolity, głównie mono-

i seskwiterpenoidy oraz pochodne fenylopropanu, które to związki stanowią frakcję lotną rośliny dającą się wydestylować w postaci olejku eterycznego. Zwracam na to uwagę, ponieważ rozprawa doktorska jest monografią naukową, a więc takie sformułowania jak „olejki eteryczne przenoszone są przez dyfuzję z liści do łodyg,...”, „olejki eteryczne gromadzone są w specjalnych strukturach wydzielniczych...” czy „lokalizacja olejków eterycznych w różnych organach rośliny....”, które są akceptowalne w potocznej mowie, w pracy naukowej powinny raczej brzmieć: „metabolity lotne/związki lotne/substancje lotne przenoszone są przez dyfuzję...”, „substancje lotne gromadzone są w specjalnych strukturach wydzielniczych...”, czy „lokalizacja związków lotnych w różnych organach rośliny...”. Inne niefortunne sformułowania które znalazły się w rozdziale 3 zatytułowanym Ekstrakcja to:

- Str. 33 (tabela 1): ekstrakty lotne (olejki z kwiatów jaśminu i pomarańczy) → ekstrakty lotne z kwiatów jaśminu i pomarańczy (np. absoluty)
- Str. 34, 35: ekstrakcja płynami nadkrytycznymi → ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym
- Str. 39: olejki eteryczne reprezentują grupę *lotnych związków aromatycznych* → jeżeli Autorka miała na myśli związki aromatyczne w rozumieniu związki zapachowe to pozostałabym przy związkach zapachowych, natomiast jeżeli chodziło o lotne związki aromatyczne jako grupę chemiczną to jest to nieprawda, i zastąpiłabym je wyrażeniem ‘lotnych metabolitów roślinnych’
- Str. 39: „.....liczne nowatorskie technologie tj. ekstrakcja nadkrytyczna” → ekstrakcja płynem w stanie nadkrytycznym nie jest metodą otrzymywania olejku eterycznego! Metodą tą można otrzymać ekstrakt zawierający związki lotne.

Przegląd piśmiennictwa kończy rozdział dotyczący suplementów diety. Autorka skrupulatnie wyjaśnia co to są suplementy diety, jakie przepisy regulują wymagania w stosunku do tej grupy środków spożywczych, kto odpowiada za ich bezpieczeństwo, a także wskazuje na zagrożenia wynikające z ich stosowania, również w przypadku suplementów pochodzenia roślinnego. Podsumowując przegląd piśmiennictwa, pragnę stwierdzić, że stanowi on bardzo dobrą podstawę do przedstawionych badań i wprowadza czytelnika do celu pracy i metodyki. Dodatkowo należy podkreślić, iż informacje zawarte w tej części są poparte prawidłowo dobranym piśmiennictwem.

Na część doświadczalną pracy składają się następujące rozdziały: Materiały i metody, Wyniki i omówienie oraz Podsumowanie. W pierwszym rozdziale znajdujemy szczegółowe zestawienie stosowanych odczynników, wzorców, aparatury oraz spis wykorzystanych substancji roślinnych. Dalej Autorka bardzo szczegółowo zapoznaje czytelnika z metodyką prowadzonych badań – przygotowaniem ekstraktów do analiz (temperatura, czas ekstrakcji, stosowane rozpuszczalniki i ich mieszaniny), ilościowego oznaczenia sumy polifenoli, flawonoidów, a także składników lotnych obecnych w ekstraktach na podstawie różnicy w zawartości olejku eterycznego wydestylowanego

z materiału roślinnego przed ekstrakcją i po ekstrakcji. Rozdział zamyka metodyka dotycząca badań nad aktywnością antyoksydacyjną otrzymanych ekstraktów.

Wyniki i omówienie to bardzo obszerny rozdział liczący 115 stron. Doktorantka prezentuje i omawia swoje wyniki bardzo szczegółowo. Zamieszczone rysunki (52) i tabele (18) ułatwiają interpretację i ocenę otrzymanych wyników. Do realizacji celu swoich badań Pani mgr Klaudia Kałwa posłużyła się jedną z klasycznych metod ekstrakcji – maceracją, odpowiadającą procesowi przygotowywania naparów herbacianych zgodnie z normą PN-ISO 3103 z 1996 roku, w modyfikacji rozpuszczalnikowej i temperaturowej. Wśród rozpuszczalników użytych do badań znalazły się: woda, nanowoda, 50% alkohol etylowy, olej rzepakowy, oraz dwa układy glicerolowo-wodne o stężeniu glicerolu równym 50 i 65%. Wstępne badania, które dotyczyły ustalenia warunków granicznych czasu prowadzenia ekstrakcji wykazały, że najwyższe przyrosty stężeń badanych składników w ekstraktach zaobserwowano w zakresie od 2 do 10 min, dlatego też ten przedział czasowy został wykorzystany w dalszych badaniach. Dla pięciu spośród sześciu stosowanych rozpuszczalników ekstrakcje prowadzono w temperaturach 50, 80 i 100°C. Wyjątek stanowił 50% etanol, przy użyciu którego ekstrakcje wykonano w temperaturze pokojowej oraz w 50°C. Jeżeli dodać do tego cztery substancje roślinne i fakt, że wszystkie ekstrakcje wykonano powtórnie dla materiału poekstrakcyjnego, by następnie w każdym z ekstraktów dokonać analizy trzech grup metabolitów roślinnych, widać ogrom eksperymentów jakie do wykonania miała Doktorantka. Wyniki poszczególnych eksperymentów są dokładnie omawiane i na bieżąco dyskutowane z dostępnymi danymi literaturowymi. Może miejscami aż nazbyt dokładnie, co absolutnie nie obniża wartości recenzowanej pracy. Chciałabym tylko zwrócić uwagę na fakt, że do publikowanych doniesień należy podchodzić w sposób krytyczny, ponieważ nie wszystkie dane zamieszczane w publikacjach naukowych są wiarygodne. W tym miejscu oprę się na dyskusji przedstawionej przez Doktorantkę, która dotyczyła wykorzystania dwóch alkoholi: metylowego i etylowego do ekstrakcji metabolitów roślinnych (str. 69-70). Z racji tego, że oba alkohole należą do tego samego szeregu homologicznego i różnią się tylko jednym atomem węgla, to z punktu widzenia chemii posiadają bardzo zbliżone właściwości ekstrakcyjne. Dlatego też najbliższe prawdy są doniesienia, które wskazują na brak różnic w ekstrakcji metabolitów roślinnych między tymi dwoma rozpuszczalnikami. Wszelkim innym pracom należałoby się przyjrzeć dokładniej, chociażby pod kątem pochodzenia materiału roślinnego, czy też zastosowanych metod analitycznych i wynikających z nich błędów statystycznych. Z drugiej strony, biorąc pod uwagę aspekt spożywczy podjętych przez Doktorantkę badań, a co za tym idzie brak toksyczności użytego rozpuszczalnika, dywagacje na temat metanolu wydają się zbędne.

Z przedstawionych przez Autorkę wyników odnoszących się do ekstrakcji i analizy poszczególnych grup związków wynika, że najkorzystniejszymi parametrami prowadzenia procesu ekstrakcji była temp. 100°C a czas ekstrakcji to 10 min. Najlepszym ekstrahentem okazała się woda, jednakże zastosowane układy glicerolowo-wodne uplasowały się zaraz za nią. Zważywszy na to, że glicerol wykazuje wysokie właściwości konserwujące, układy

glicerolowo-wodne wydają się więc bardzo dobrą alternatywą dla wody, która należy do bardzo nietrwałych rozpuszczalników. Podobne wnioski Doktorantka wyciągnęła z danych otrzymanych w wyniku analizy ekstraktów wtórnych, czyli ekstraktów otrzymanych z materiału poekstrakcyjnego. Wynik ten znajduje swoje potwierdzenie w teorii ekstrakcji, która mówi, że wytrawianie/ekstrakcja materiału roślinnego metodą maceracji trwa do momentu wyrównania stężeń między surowcem roślinnym a dodanym do niego rozpuszczalnikiem. A więc w wyniku jednokrotnej ekstrakcji jesteśmy w stanie wydobyć z rośliny maksymalnie połowę składników, jakie nas interesują.

W dalszej części badań Doktorantka dokonała analizy aktywności antyoksydacyjnej otrzymanych ekstraktów, wykazując ich wysoki potencjał przeciwutleniający, korelujący z zawartością polifenoli. Dlatego też najwyższą aktywnością charakteryzowały się ekstrakty wodne, natomiast zaraz po nich ekstrakty glicerolowo-wodne.

Podsumowując stwierdzam, że cel dotyczący wykorzystania glicerolu jako ekstrahenta związków biologicznie czynnych obecnych w roślinach leczniczych, w aspekcie wytwarzania płynnych suplementów diety został zrealizowany, a osiągnięte wyniki mają charakter poznawczy i stanowią istotny wkład w rozwój dziedziny.

Interesującym aspektem badań podjętych przez Doktorantkę i wartością dodaną tej pracy była destylacja olejków eterycznych z materiału roślinnego poekstrakcyjnego. Posłużyła ona oszacowaniu zawartości składników lotnych w ekstraktach, ale wyniki płynące z analizy jakościowej składników obecnych w tak otrzymanych olejkach dają ciekawą perspektywę powtórnego wykorzystania materiału roślinnego odpadowego. Wyniki składu chemicznego tych olejków nie odbiegają bardzo znacznie od składu wykazanego dla roślinnych materiałów wyjściowych. Zawartości poszczególnych składników są oczywiście różne, ale taki odpadowy, a może raczej odzyskany materiał roślinny mógłby stanowić źródło olejków eterycznych chociażby dla chemii gospodarczej.

Podsumowując należy stwierdzić, iż badania własne Doktorantka zaplanowała dobrze i systematycznie zrealizowała, a uzyskane wyniki omówione są w kontekście aktualnego piśmiennictwa z dziedziny (375 pozycji). Recenzowana dysertacja mgr inż. Klaudii Kałwa została opracowana zgodnie z zasadami przyjętymi dla prac doświadczalnych. Napisana jest poprawną polszczyzną i jest bardzo przejrzysto opracowana graficznie – wyniki badań Autorka prezentuje w 22 tabelach oraz na 55 rysunkach. Wszystkie rozdziały dysertacji stanowią spójną całość.

Niestety przy redagowaniu pracy Autorka nie uchroniła się od błędów edytorskich co jest nieuniknione, zwłaszcza jeśli praca liczy ponad 200 stron. W żaden sposób nie wpływa to na wartość pracy, ale z obowiązku recenzenta przytaczam je poniżej:

- strona 16, rozdział 1.3.1: Autorka pisze „Jego niska toksyczność oraz **brak** zapachu i **smaku** pozwalają na stosowanie glicerolu jako emulgatora.” Glicerol jest raczej słodki!

- strona 29, rysunek 2: ze wzoru podpisanego 'katechina, epikatechina' nie wynika czym różnią się oba związki. Należałoby oznaczyć konfigurację grupy OH przy węglu C-2, lub po prostu narysować strukturę jednego z nich. Ponadto zamiast nazwy 'naringenina' powinna być 'naryngenina'.
- strona 70: cytowanie: jest Covan i in. 1999 → powinno być Covan 1999
- strona 138, tabela 11 c.d.:  $\gamma$ -cadinene oraz  $\gamma$ -kadinen to ten sam związek tyle, że z nazwą polską i angielską, ale w tabeli mają one inne indeksy i czasy retencji!? Ponadto w nazwie epoksy allo-alloaromadendren należy usunąć jedno 'allo'
- strona 143, tabela 13 i dalsze tabele: kamfor → kamfora
- strona 145, tabela 14: nie widzę tymolu wśród składników zamieszczonych w tej tabeli, a z tekstu wynika, że jest to główny związek

### Wnioski końcowe

Przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi formalne i merytoryczne stawiane w ustawie o stopniach naukowych i tytule naukowym. Na tej podstawie wnioskuję do **Rady Dyscypliny Naukowej Technologia Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie** o przyjęcie niniejszej rozprawy i dopuszczenie **mgr inż. Klaudii Anny Kałwa** do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

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

*A. Ludwiczuk*