

РЕЦЕНЗИЯ

на дисертационен труд за придобиване на образователната и научна степен „доктор“ в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление: 4.3. Биологически науки", научна специалност: Ботаника

Автор на дисертационния труд: РУМЕН ВЕЛИНОВ ДЕНЕВ, задочен докторант към изследователска група „Хемоекология и природни продукти“, секция „Приложна ботаника“, отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ на ИБЕИ-БАН

Научен ръководител: проф. д-р Страхил Христов Берков

Тема на дисертационния труд: „GC-MS анализ на силирани амарилисови алкалоиди“

Рецензент: доц. д-р Ивайла Недялкова Динчева, Агробιοинститут-София, ССА; Област на висше образование 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Биологично активни вещества“

1. Кратко представяне на кандидата

Докторантът Румен Велинов Денев е роден на 22.09.1983 г. в Златоград. През периода 2006–2008 г. следва в Химическия факултет на Софийския университет „Св. Климент Охридски“, където придобива образователно-квалификационна степен магистър по специалност „Съвременни спектрални и хроматографски методи за анализ“. От ноември 2009 г. е назначен за научен сътрудник-химик в Института по органична химия с Център по фитохимия при БАН. В периода 2017–2024 г. работи като химик в

Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания (ИБЕИ-БАН). От 2024 г. е сервизен инженер в АСМ2 ООД, като същевременно продължава и научната си дейност в ИБЕИ-БАН. Провежда специализация в Университета в Пардубице (Чехия) при проф. Ing. Michal Holčárek, Ph.D. (01.05.2011 – 01.09.2011). Има 18 научни публикации в реферирани и индексирани в световноизвестни бази данни за научна информация (Web of Science и Scopus). Дисертационният труд е разработен в рамките на проект № ПБУ-67 от 16.12.2024 г. /BG-RRP-2.017-0021-C01 по Националния план за възстановяване и устойчивост на Република България.

2. Представени документи по процедурата

Представените от докторанта Румен Денев материали отговарят на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ-БАН. Включени са следните задължителни документи: дисертационен труд; автореферат; справка за приносите; списък на публикациите по темата на дисертацията и копия от самите публикации; списък на цитиранията на трудовете по темата на дисертацията; научна автобиография с пълен списък на публикациите; диплома за магистърска степен – копие, заверено от Научния секретар на ИБЕИ-БАН; протокол от заседанието, насочило дисертацията за защита; справка за проведения учебен процес и получените кредити; резюме на дисертацията на английски език. Документите са представени коректно и в съответствие с изискванията.

3. Обща характеристика на дисертационния труд – обем и структура

Дисертационният труд е представен в общ обем от 120 страници и съдържа следните части: заглавна страница; благодарности (1 стр.); увод (1 стр.); литературен обзор (16 стр.); цел и задачи (1 стр.); публикации по темата (47 стр.); заключение (1 стр.); основни изводи (2 стр.); декларация за

оригиналност и достоверност (1 стр.); приноси (1 стр.); използвана литература (6 стр.); списък на научните публикации с пълно библиографско описание (1 стр.); приложение 1 – допълнителни материали към публикациите (39 стр.). Структурата на дисертацията съответства на изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ-БАН. Съгласно чл. 9 от правилника, главите „Материали и методи“, „Резултати“ и „Обсъждане“ са представени под формата на три научни публикации, което е напълно допустимо и придава на труда завършен и публикационно обоснован характер.

4. Актуалност на темата

Темата на дисертационния труд е безспорно актуална, тъй като амарилисовите алкалоиди представляват група природни съединения с изключително висока фармакологична стойност. Галантаминът, ликоринът, хемантаминът и други представители на това семейство проявяват инхибиране на ацетилхолинестеразата (приложение при болестта на Алцхаймер), антитуморна, антивирусна и противовъзпалителна активност. Коректното идентифициране и количествено определяне на тези съединения в растителни проби е от съществено значение за хемотаксономични, фармакологични, биотехнологични изследвания и за контрол на качеството на растителни суровини. GC-MS е един от най-широко прилаганите методи за анализ на тези алкалоиди, но неговите ограничения - ниска летливост на полярните съединения, термолабилност и слаба детекция са добре известни. В този контекст, изследването на възможностите на силирането като подход за преодоляване на тези ограничения има не само научно, но и пряко практическо значение. Разработването на надеждни аналитични методи за контрол на растителни суровини, съдържащи

амарилисови алкалоиди, е ключов етап в създаването на устойчиви индустриални вериги за производство на лекарствени вещества от растителни източници.

5. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата

Литературният обзор е разработен задълбочено и демонстрира много добра осведоменост на докторанта относно съвременното състояние на изследванията в областта на амарилисовите алкалоиди тяхното химично разнообразие, хемотаксономично значение и биологична активност. Представена е актуална информация за структурата и класификацията на над 600 известни амарилисови алкалоида, както и за тяхното значение във фармакологията и медицината. Обзорът обхваща 73 източника от периода след 2000 г., като цитираните трудове са изцяло на латиница и включват реномирани международни списания в областта на фитохимията, аналитичната химия и фармакологията. Особено задълбочено са разгледани методите за анализ – от пробоподготовката до инструменталните техники (TLC, HPLC, CE, GC-MS), като акцентът е поставен върху предимствата и ограниченията на GC-MS и възможностите за дериватизация. Кандидатът демонстрира отлично познаване на мас спектралната фрагментация и хроматографското поведение на амарилисовите алкалоиди, което е от ключово значение за интерпретацията на получените резултати. Всичко това свидетелства за високо ниво на теоретична подготовка и способност за критичен анализ на научната литература.

6. Съответствие на избраната методика на изследване с поставената цел и задачи на дисертационния труд

Методиката, използвана в дисертационния труд, е изключително добре планирана и напълно съответства на поставената цел и формулираните

задачи. За постигане на целите са приложени съвременни аналитични подходи:

- ✓ GC-MS анализ с електронен удар (EI) при 70 eV и капилярна колона DB 5MS – осигурява висока разделителна способност и възпроизводимост.
- ✓ Силиране с BSTFA в пиридин – превръща полярните и термолабилни алкалоиди в по-летливи и стабилни триметилсилилни производни.
- ✓ Паралелен анализ на несилирани и силирани стандартни вещества и растителни екстракти – дава възможност за сравнително проучване на фрагментационните модели.
- ✓ Използване на индекси на задържане (RI) – улеснява идентификацията на изомери.
- ✓ Валидиран количествен метод за определяне на галантамин в *Hippeastrum papilio* с директно инжектиране на водни екстракти – съществен принос към зелената аналитична химия.
- ✓ Статистическа обработка на данните, включваща ANOVA и регресионен анализ.

Използваните техники са научно обосновани, съвременни и напълно подходящи за постигане на целите на изследването. Особено впечатление прави разработеният „зелен“ метод за количествен анализ, който елиминира използването на токсични органични разтворители и позволява директно инжектиране на водни екстракти. Това е значителна стъпка напред в сравнение с конвенционалните методи, които изискват многократни екстракции с хлороформ или дихлорометан.

7. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите

Получените резултати имат безспорна научна стойност и значително разширяват знанията относно приложението на GC-MS анализа при

изследване на амарилисови алкалоиди. Те са публикувани в реномирани международни списания с импакт фактор – Rapid Communications in Mass Spectrometry (Q2, IF 2.586 и Q3, IF 1.7) и Journal of Chromatography A (Q1, IF 4). Докторантът е съавтор и в трите публикации, като в третата е първи автор, което свидетелства за неговото водещо участие в изследователската работа. Публикациите са добре структурирани, с ясен експериментален дизайн, прилагане на съвременни методи и ясно обосновани резултати и изводи. Статистическата обработка е коректна и надеждна.

Изследванията убедително показват, че силирането води до съществено подобряване на летливостта, термичната стабилност, хроматографското разделяне и чувствителността на анализа при редица алкалоиди. Доказано е, че силирането позволява откриване на съединения, които остават недетектирани при директен анализ на несилирани проби. Особено важни са резултатите, свързани с: подобрената детекция на ликорин и други полихидроксилирани алкалоиди; стабилизирането на термолабилни съединения от хемантаминов и крининов тип; възможността за разграничаване на естествени съединения от артефакти; подобрената структурна информация, получавана след дериватизация.

Научната стойност на резултатите се засилва от идентифицирането на нови алкалоиди и разработването на нови аналитични методи за тяхното количествено определяне. Изводите са ясно формулирани, логически издържани и напълно съответстват на получените експериментални данни. Особено впечатление прави третата публикация в Journal of Chromatography A, която представя иновативен „зелен“ метод за количествен анализ на галантамин. Този труд демонстрира не само задълбочени познания в областта на аналитичната химия, но и способност за разработване на методологии, съответстващи на принципите на зелената химия.

Резултатите имат не само фундаментално значение, но и сериозна практическа приложимост във фитохимията, фармакогнозията, биотехнологията и контрола на растителни суровини.

8. Оценка на научните приноси

Научните приноси на дисертационния труд могат да бъдат обобщени в следните направления:

Създадена е библиотека от EIMS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди – ценен ресурс за фитохимични и хемотаксономични изследвания.

Извършен е подробен метаболитен анализ на алкалоидна фракция от *Narcissus cv. Hawera* с доказано антидепресивно и анксиолитично действие.

Идентифицирани са 7 нови амарилисови алкалоида:

Narcissus cv. Hawera: 2-оксомезембрин и 2-оксо-епис-мезембренол;

Galanthus nivalis: 11-О-ацетилхамайн, 3-(3'-О-хидроксипутаноил)хамайн, 11-О-(3'-ацетоксибутаноил)хамайн и 3,11-О-(2',2''-дипутаноил)хамайн;

Narcissus poeticus: 11-О-(3-хидроксипутаноил)хемантамин.

Разработен и валидиран е GC-MS метод за количествено определяне на галантамин в *Hippeastrum papilio*, който доказва високото му съдържание в този вид – 7,44 mg/g суха маса в луковиците.

Разработен и валидиран е „зелен“ GC-MS метод за количествен анализ на амарилисови алкалоиди чрез директно инжектиране на подкислен воден екстракт, без използване на токсични органични разтворители.

Установени са фрагментационните пътища на алкалоиди от хемантаминов и крининов тип, което позволява разграничаване на епимерни форми и идентифициране на неизвестни съединения.

Тези приноси имат както фундаментално значение за разбирането на химичното разнообразие и биосинтезата на амарилисовите алкалоиди, така

и пряко практическо приложение в областта на фитохимията, фармакологията и контрола на качеството на растителни суровини.

9. Критични бележки към дисертационния труд

Въпреки високото научно ниво на дисертационния труд, могат да бъдат отправени някои критични бележки, които не омаловажават неговите качества, но биха могли да послужат за усъвършенстване на изследователския подход:

Хронологични несъответствия и анахронизми

Разминаване в цитирания проект: На стр. 2 се посочва, че дисертацията е разработена по проект № ПБУ-67 от 16.12.2024 г.. В същото време, приложената основна научна публикация в списание *Rapid Communications in Mass Spectrometry* е приета и публикувана през април 2021 г. (финансирана по договори от 2016 и 2017 г.). Хронологически е невъзможно научен труд от 2021 г. да бъде заченат или изпълнен по проект, стартирал в края на 2024 г.

История на изследванията: На стр. 19 се твърди, че „GC-MS анализът на АА започва да се ползва по-интензивно в началото на 20-век“. Това е груба фактологична неточност. В началото на XX век газовата хроматография и маспектрометрията изобщо не са съществували (интензивното им комбиниране и навлизане във фитохимията започва през втората половина на XX век, около 60-те и 70-те години).

Пропуски в Литературния обзор и структурата

Ограничен обхват на биологичната активност: В литературния обзор (стр. 13-15) подробно са описани ефектите на галантамин, ликорин и хемантамин. Но тъй като основният фокус на пъвата приложена статия е върху алкалоидите от тип Sceletium, тяхната фармакологична активност трябва да бъде представена в теоретичната част на дисертацията, а не да се появява в дискусията на статията.

Възможности за оценка на практическата приложимост на разработения метод

Предложеният зелен метод за количествен анализ на галантамин демонстрира предимства по отношение на бързина и екологичен профил. Допълнителна оценка на разходите, времето за анализ и сравнение с конвенционални подходи би подпомогнала оценката на неговия потенциал за по-широко приложение.

Дребни технически и стилистични неточности

В отделни части на дисертацията се наблюдават повторения и стилистични несъвършенства, които не влияят върху научната стойност на труда, но биха могли да бъдат прецизирани с оглед подобряване на четимостта.

10. Заключение

Представеният дисертационен труд на Румен Велинов Денев представлява завършено, актуално и значимо научно изследване в областта на ботаниката, фитохимията и аналитичната химия. Поставената научна цел е успешно изпълнена. Получени са оригинални резултати, разработени са нови аналитични подходи и са постигнати както научни, така и приложни приноси с висока стойност. Дисертационният труд съдържа нови знания, има ясно изразен приносен характер и демонстрира способността на кандидата да провежда самостоятелни научни изследвания.

Докторантът е съавтор и в трите публикации, свързани с темата на дисертацията, като в една от тях е първи автор, което потвърждава неговото водещо участие в научноизследователската работа.

След като се запознах подробно с представените материали по защитата, считам, че дисертационният труд напълно отговаря на изискванията на Закона за развитието на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за неговото прилагане, както и на вътрешните нормативни

документи на ИБЕИ–БАН. На това основание давам убедено **положителна оценка** на дисертационния труд и препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Румен Велинов Денев образователната и научна степен „доктор“ по докторска програма „Ботаника“.

Дата: 30.06.2025 г.

РЕЦЕНЗЕНТ:

гр. София

(доц. д-р Ивайла Динчева)