

## **РЕЦЕНЗИЯ**

**от д-р Иванка Божкова Семерджиева**

доцент в Института по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН (ИБЕИ),  
член на научното жури за придобиване на ОНС „Доктор“, съгласно заповед №  
31/28.05.2026г. на Директора на ИБЕИ при БАН

**Относно:** дисертационен труд представен за присъждане 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“ (01.06.03).

**Автор на дисертационния труд:** Румен Велинов Денев, задочен докторант към отдел „Растително и гъбно разнообразие и ресурси“ на ИБЕИ-БАН, секция „Приложна ботаника“, изследователска група „Хемоекология и природни продукти“;

**Тема на дисертацията:** „GC-MS анализ на силирани амарилисови алкалоиди“.

**Научен ръководител:** проф. д-р Страхил Христов Берков - Институт по биоразнообразие и екосистемни изследвания – БАН;

### **1. Обща характеристика на дисертационния труд - обем и структура**

Характерен белег на видовете от сем. Amaryllidaceae е биосинтезът на амарилисови алкалоиди (АА). Тези алкалоиди притежават широк спектър от биологични активности като антитуморна, антивирусна, противовъзпалителна и инхибират ацетилхолинестеразата. Количественото определяне на АА е в основата за хемотаксономични и фармакологични изследвания, както и подход при избор на изходна суровина в биотехнологичните практики и за провеждане на качествен контрол. За разделяне и анализ на алкалоидни смеси се използват различни аналитични методи, сред които тънкослойна хроматография (TLC), високоефективна течна хроматография (HPLC), капилярна електрофореза (CE) и газова хроматография (GC). Всеки от тези методи има специфични предимства и ограничения, които обуславят избора им за конкретно аналитично приложение. Газовата хроматография, съчетана с маспектрометрия с електронна йонизация (GC–EI-MS), е един от най-широко

използваните методи за анализ на АА, тъй като осигурява възпроизводими масспектри, подходящи за идентификация чрез сравнение с референтни спектрални библиотеки. Основното ограничение на метода е невъзможността за директен анализ на термолабилни, нелетливи и силно полярни съединения, както и на техните соли. Това ограничение се преодолява, чрез предварително дериватизиране на пробите, най-често чрез силилиране. В този контекст, предоставеният ми за рецензиране дисертационен труд е актуален и има съществена научноприложна стойност. Той допринася за разширяване на аналитичните възможности на GC–EI-MS анализа и създаване на библиотека от EI-MS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди чрез паралелен GC-MS анализ. Получените резултати биха могли да подобрят прецизността при идентифицирането на амарилисовите алкалоиди (АА) и да разширят приложимостта на метода при техния количествен анализ.

Дисертационният труд е с общ обем от 142 страници, което отговаря на изискванията на Глава 4, т.9 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и за заемане на академични длъжности в ИБЕИ при БАН (Приет от НС, изменен на 25 ноември 2022). Той съдържа всички необходими раздели, които са добре структурирани и балансирани. Уводът е представен на две страници, а литературният преглед обхваща около 12% от общия обем на труда. Целта е ясно формулирана, а за нейното изпълнение са определени три задачи, които са изпълнени успешно. Главите “Материали и методи”, “Резултати” и “Обсъждане” в представения дисертационен труд, са заместени от скрепени три броя научни публикации, което не противоречи на чл. 9 от Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ИБЕИ, БАН. В една от публикациите докторантът е първи автор, а в останалите е втори или трети автор. И трите научни публикации са публикувани в международни списания, реферирани и индексирани в Web of Science и/или Scopus с квартили. Получените резултати са с научна и практическа стойност и публикуването им в престижни списания е още едно доказателство за значимостта на проведеното изследване.

Списъкът с научните публикации, с пълното библиографско описание, основните изводи и приноси са представени на пет страници в дисертационния труд. Работата си докторантът е онагледил с общо осем схеми, 18 фигури, а резултатите са групирани в 10 таблици. Допълнителните материали (приложения) са представени на 40 страници.

Представеният автореферат (25 стр.) е изготвен според изискванията и съдържа основната информация от изследванията, които са включени в дисертационния труд. Налице е резюме на дисертационния труд на английски език (1 стр.). Не се установява плагиатство съгласно предоставения доклад (20.04.2026).

## **2. Литературна осведоменост и теоретична подготовка на кандидата**

Литературният преглед в дисертационния труд обхваща 73 заглавия, които са свързани с ботаническото описание, класификация и филогения на Amaryllidaceae, както и с биосинтеза на АА и алкалоидния им състав. Голяма част от цитираните източници са от последните 10 години и са на латиница. Литературният обзор е структуриран от няколко тематични направления, които очертават необходимостта от провеждане на това изследване. Описан е биосинтезът на амарилисови алкалоиди и факторите, които му влияят. Посочена е значимостта на различния синтез и вид на АА за хемотаксономията на сем. Amaryllidaceae. Подчертани са предимствата и недостатъците на различните методи за анализ, както и предимствата на дериватизиране/силиране на алкалоидите.

Докторантът е усвоил специфичната фитохимична терминология, запознат е отлично с проблематиката на изследвания проблем. Представеният материал демонстрира добра техническа осведоменост и подготовка на докторанта.

## **3. Методичен подход**

Методичният подход в дисертационния труд е добре обоснован и адекватен на поставената цел и задачи, което гарантира надеждността на получените резултати и изпълнението на изследователската програма. При разработването на дисертационния труд са използвани три растителни вида от семейство Amaryllidaceae, подсемейство Amaryllidoideae – *Narcissus poeticus* L., *Galanthus nivalis* L. и *Hippeastrum papilio* Van Scheepen, както и един хибрид – *Narcissus* cv. Hawera. Всички изследвани растителни видове се характеризират със синтез на различни по структура АА. При *N. poeticus* преобладават ликоринови и нарциклазинови производни, при *G. nivalis* галантаминов тип алкалоиди, а при *H. papilio* хомиликоринови и свързани структури. Особено внимание е отделено на пробоподготовката и екстракцията на АА, която представлява ключов етап за осигуряване на надежден и научно обоснован анализ. Екстракцията на АА в растителния материал от целевите видове е подложен на стандартен киселинно-основен протокол, широко утвърден в аналитичната практика. Деривацията

(силирането) е извършена по утвърдени методики. За провеждане на GC-MS анализа са използвани съвременни инструментални системи – Thermo Scientific Focus GC / DSQ II (EI, 70 eV, йонен източник 230°C) и Agilent 6890+/5975 MSD, в комбинация с капилярна колона DB-5MS. Приложената аналитична апаратура е адекватно подбрана и съответства на изискванията за надежден анализ на амарилисови алкалоиди. Валидирането на метода включва оценка на специфичност и селективност, линейност, граници на количествено и качествено определяне (LLOQ и LLOD, при SIM режим), както и прецизност, изразена чрез относително стандартно отклонение (RSD). Извършена е оценка на точността чрез процент на възстановяване при нива на добавка 10%, 50% и 100%, като са изследвани също стабилността на анализите и матричният ефект (MF). Прилаганият валидиращ подход е изчерпателен и съответства на съвременните изисквания за GC-MS анализ. Установени са границите на детекция на АА и зависимостите на термалната устойчивост.

Сравнението на GC-MS характеристиките (разделяне, стабилност, летливост и фрагментация), както и на възможностите за качествен и количествен анализ на силирани и несилирани амарилисови алкалоиди в растителни проби от таргетните видове, има потенциал да допринесе за преодоляване на някои от ограниченията на GC-MS метода. Създадена е библиотека от EI-MS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди от целевите видове и е направен паралел за сравнение между GC-MS анализ на несилирани и силирани стандартни вещества. Резултатите са обработени статистически, което позволява правилното им анализиране и интерпретиране.

#### **4. Значимост и убедителност на получените резултати, интерпретациите и изводите**

Дисертационната работа на Румен Денев представлява задълбочено изследване за подобряване на аналитичните възможности на GC–EI-MS анализа и създаване на библиотека от EI-MS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди. Получените резултати са описани детайлно, анализирани и дискутирани в приложените научни публикации. От анализа и статистическата обработка са установени следните основни резултати:

- ✓ Силирането на алкалоидни фракции и екстракти е ефективен подход за изследване на биосинтезата на амарилисови алкалоиди;

- ✓ При алкалоиди с две или повече хидроксилни групи силирането повишава летливостта, подобрява разделянето и понижава границите на детекция (напр. при ликорин, който в несилирано състояние се открива слабо при ниски концентрации);
- ✓ При хемантаминови/крининови алкалоиди с C11-хидроксилна група силирането повишава термичната стабилност и подобрява хроматографските характеристики; характерен пример е хемантидинът, който след силиране се детектира ясно, включително като разделени епимери;
- ✓ Паралелният анализ на силирани фракции и тотални екстракти позволява разграничаване на естествени съединения от артефакти и повишава достоверността на данните за алкалоидния състав;
- ✓ Силирането повишава чувствителността на анализа и осигурява детекция на минорни алкалоиди, недетектируеми в несилирани проби;
- ✓ Дериватизацията предоставя информация за броя хидроксилни групи и подпомага структурната идентификация;
- ✓ Епимерни хемантаминови и крининови алкалоиди могат да се разграничат чрез масспектрални характеристики и индекси на задържане;
- ✓ Конфигурацията на 5,10b-етановия мост не се определя еднозначно чрез GC-MS и изисква допълнителни спектрални методи (напр. CD);
- ✓ Естерни хидроксibuтирилни алкалоиди се разпадат при GC-MS до 2-бутеноилни производни, което е важно за интерпретацията;
- ✓ EI-фрагментацията позволява локализиране на заместители и подпомага идентификацията на неизвестни и нови алкалоиди;

Актуалността и научната значимост на представения дисертационен труд са безспорни. Доказването на ефективността на силирането на алкалоидни фракции и екстракти като подход за изследване на биосинтезата на амарилisови алкалоиди има съществено значение, както за науката, така и за практиката. Подобряването на метода е предпоставка за надеждното откриване и хроматографско характеризиране на АА. Изводите са ясно и коректно формулирани.

## **5. Критични бележки към дисертационния труд**

Дисертационният труд на докторант Румен Велинов Денев е написан в съответствие с изискванията на Правилника за условията и реда за придобиване на научни степени и

за заемане на академични длъжности в ИБЕИ при БАН. Критичните бележки по дисертационния труд не са съществени и не намаляват достойнствата на разработката. Пропуските биха могли да се групират в две направления: (1) граматични и стилистични грешки; (2) технически грешки и оформление на написания труд;

Бих искала да препоръчам на докторанта за бъдещи научни изследвания да избягва поетичния стил на изразяване, защото той е несъвместим с научните Ботанически и Фитохимични изследвания. В литературния обзор за Сем. Amaryllidaceae, подсем. Amaryllidoideae на много места се използват поетични определения като: „красивият им вид“, „малко растение“, „красива бяла окраска“, „символ на пролетта и възраждането“, „ефектни цветове, истински спектакъл на природата със своята характерна "пеперудена" окраска“, „миниатюрна луковица“ и др. В ботаническото описание на видовете е коректно да се ползват изданията на Флорите на България, Европа или друга флора, където термините са определени и приети. Препоръчвам на докторанта при бъдещи научни публикации да бъде по-прецизен по отношение на граматиката и техническото оформление на текста. В труда EI-MS анализът е изписан слято, което в съвременните публикации не е прието. Родовото име на вида, след първото си съобщаване в текста, е по-правилно да бъде съкращавано в последващо споменаване. В цел и задачи (стр.21) на дисертационния труд са посочени растенията, от които ще се получават екстракти и АА (*N. poeticus*, *Narcissus* cv. Hawera, *G. nivalis* и *H. papilio*), но в автореферата в точка 5.2. (стр.13) се съобщават и за други видове *Crinum moorei* L. и *Amaryllis belladonna* L., от които са анализирани алкалоидни фракции, които не са споменати в труда. Тези неточности водят до объркване. Считам, че е неуместно в заключението на дисертационния труд и автореферата, отново да се обяснява целта, а трябва да се акцентира на резултатите. Критичните ми бележки не намаляват значимостта на дисертационният труд.

#### **Имам няколко въпроса към докторанта:**

1. С каква цел в дисертационния труд сте показали схема на Филогения на сем. Amaryllidaceae според Meerow (Фигура 1, стр. 6)?
2. До каква степен силирането може да промени профила на наблюдаваните алкалоиди и как се контролира възможното образуване на артефакти?
3. Какви са основните ограничения при използване на EI-MS за структурно характеризиране на амарилисови алкалоиди?
4. Какви нови възможности в практиката предоставя силирането за откриване на минорни алкалоиди?

## **6. Характер на научните приноси,**

Приемам авторската справка за приносите. Те са формулирани ясно и коректно и отразяват получените резултати от докторанта. Всичките приноси са оригинални и са резултат от изпълнението на поставената цел. За първи път е създадена библиотека от EI-MS спектри на несилирани и силирани амарилисови алкалоиди чрез паралелен GC-MS анализ на стандартни вещества и алкалоидни фракции от различни видове амарилисови растения. Идентифицирани са нови амарилисови алкалоиди в *Narcissus cv. Hawera*, в *G. nivalis* и в *N. poeticus*. Разработен и валидиран е GC-MS метод за количествен анализ на галантамин в *H. papilio*. Разработен и валидиран е „зелен“ GC-MS метод за количествен анализ на АА в растителни проби, чрез директно инжектиране на подкислен воден разтвор, като се избягва използването на токсични органични разтворители. Описаните в дисертационния труд резултати дават нова информация и разширяват познанията за алкалоидния състав на видовете от Amaryllidaceae. Резултатите имат също така и научно-приложен характер, защото подобряването на GC-MS анализа ще допринесе за повишаване на контрола на суровини във фармацевтичната индустрия, които съдържат АА.

## **7. Оценка на качеството на научните трудове, отразяващи изследванията по дисертацията и личният принос на докторанта**

Проведените изследвания в дисертационния труд са публикувани в три научни публикации, които се реферират във WoS и Scopus. Част от резултатите са включени в две научни статии публикувани в Rapid Communications in Mass Spectrometry, Q2, с импакт фактор (IF 2.394), а други в Journal of Chromatography A Q1, с импакт фактор (IF 4.0). Всичките публикации са преминали през оценка на рецензенти и отговарят напълно на минималните изисквания, предвидени за докторанти в БАН. При необходим минимум от 30 кредита, докторантът има 60 кредита по този показател. Освен посочените публикации, той е представил резултатите в три научни форума. За актуалността и значимостта на проведеното изследване говорят установените 5 цитата. Считам, че експериментите, резултатите, тяхното представяне и анализ са в голяма степен лично дело на докторанта. Представената информация за справките и публикациите са верни и отговарят на обективната истина. Това е подкрепено и от декларацията за оригиналност и достоверност, предоставена от докторанта (т.5.2, стр.

## **8. Мотивирано заключение:**

Дисертационният труд на Румен Велинов Денев представлява съществен принос към идентификацията, подобряването и валидирането на GC-MS анализ на стандартни вещества и алкалоидни фракции от различни видове амарилисови растения. Резултатите представляват оригинален принос в науката и отговарят на всички изисквания на Закона за развитие на академичния състав в Република България (ЗРАСРБ), Правилника за прилагане на ЗРАСРБ и Правилника за прилагане на ЗРАСРБ на БАН. Представените материали и резултати напълно съответстват на специфичните изисквания на Правилника на ИБЕИ-БАН за приложение на ЗРАСРБ. Дисертационният труд показва, че докторантът притежава задълбочени теоретични знания и умения по научна специалност „Ботаника“. Той демонстрира висока техническа компетентност, качества и умения за самостоятелно провеждане на научно изследване.

Поради гореизложеното, убедено давам своята положителна оценка за проведеното изследване и предлагам на почитаемото научно жури да присъди образователната и научна степен „Доктор“ на Румен Велинов Денев в област на висше образование: 4. Природни науки, математика и информатика, професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Ботаника“.

08.07.2026

Изготвил рецензията: .....