

## RECENZJA

pracy doktorskiej Pani mgr Moniki Ciechomskiej

pt.: „Nowoczesne analityczne techniki badania związków psychoaktywnych i trujących  
w popularnych roślinach ozdobnych”

Zainteresowanie roślinnymi alkaloidami, wykazującymi bardzo zróżnicowaną aktywność biologiczną towarzyszy człowiekowi już od wieków, gdyż wiele bowiem z tych substancji jest z powodzeniem używanych w lecznictwie. Szczególną grupę, w tym przypadku, stanowią związki oddziałujące na ośrodkowy układ nerwowy, a szczególnie te o właściwościach halucynogennych, obecne między innymi w roślinach z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*) oraz powojowatych (*Convolvulaceae*). Niestety, brak jednoznacznych uregulowań prawnych powoduje, że rośliny te jako materiał powszechnie i legalnie dostępny znajduje wielu zwolenników, zwłaszcza wśród młodych osób, poszukujących nowych „wrażeń” narkotycznych. Zdarza się jednak, że celowe lub przypadkowe spożywanie tych psychoaktywnych roślin, w niektórych przypadkach kończy się poważnymi konsekwencjami zdrowotnymi, a nawet zgonem. Dlatego też, niniejsza dysertacja doskonale wpisuje się w aktualne zapotrzebowanie na analitykę chemiczną substancji psychotropowych pochodzenia naturalnego, chociażby ze względu na dynamicznie zmieniający i rozwijający się rynek tzw. dopalaczy. W tej sytuacji opracowywanie nowych metod analitycznych umożliwiających wykrywanie i oznaczanie tego typu substancji jest zadaniem niezwykle ważnym, a badania przeprowadzone w ramach pracy doktorskiej mgr Moniki Ciechomskiej wpisują się w ten nurt idealnie. Podjęty temat jest ważny z praktycznego punktu widzenia i bardzo ciekawy od strony analitycznej.

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Moniki Ciechomskiej została wykonana w Pracowni Chemii Sądowej Zakładu Chemii Analitycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Kościelniaka i dr hab. Michała Woźniakiewicza, prof. UJ. Celem pracy było opracowanie skutecznych i efektywnych metody analitycznych umożliwiających analizę alkaloidów tropanowych (atropiny i skopolaminy) w roślinach z rodziny *Solanaceae* (w tym gatunków *Datura*, *Brugmansia*, *Atropa*, *Scopola* oraz *Hyoscyamus*), a także alkaloidów sporyszu (erginy, ergometryny i lizergolu) występujących w roślinach *Ipomoea purpurea* i *Ipomoea tricolor*. Realizacja tak postawionego celu wymagała od Doktorantki optymalizacji etapu przygotowania próbki, mając na

uwadze pracę z złożoną i skomplikowaną matrycą, jaką stanowi zróżnicowany materiał roślinny. Ogromnym wyzwaniem było znalezienie skutecznej procedury ekstrakcyjnej umożliwiającej nie tylko izolację badanych alkaloidów z analizowanego materiału roślinnego, ale przede wszystkim eliminacji składników matrycy odpowiedzialnych za niepożądane interferencje oraz ewentualne, obniżenie żywotności stosowanej aparatury analitycznej. Wśród narzędzi badawczych używanych przez Doktorantkę zastosowanie znalazły techniki ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomagane promieniowaniem mikrofalowym lub ultradźwiękami, pozwalające skutecznie izolować badane anality oraz ekstrakcja typu QuEChERS jako efektywna metoda oczyszczania próbek o złożonym skomplikowanym składzie matrycy. Natomiast do oznaczeń końcowych badanych analitów zastosowano chromatografię gazową lub elektroforezę kapilarną w układzie ze spektrometrem mas (odpowiednio GC-MS lub CE-MS).

Poniżej przedstawię moje uwagi dotyczące zarówno strony redakcyjnej przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej, jak i elementów nowości naukowej i znaczenia efektów badań naukowych opisanych w rozprawie mgr Moniki Ciechomskiej.

Przedstawiona dysertacja jest napisana w języku polskim, ma układ klasyczny, w skład którego wchodzi 13 rozdziałów, których zawartość opisano na 284 stronach. Całość została podzielona na dwie główne części, pierwszą stanowi część literaturowa oraz drugą tzw. część doświadczalna. Opis literaturowy został poprzedzony wykazem skrótów stosowanych w pracy, w którym przedstawiono ich rozwinięcie zarówno w języku polskim jak i angielskim. Dodatkowo, na początku rozprawy Autorka zamieściła streszczenie badań w języku polskim i angielskim. Część literaturową rozpoczyna rozdział zatytułowany „Geneza i przedmiot badań”, w którym Doktorantka wprowadza czytelnika w podjętą tematykę badawczą oraz przedstawia charakterystykę roślin psychoaktywnych z rodziny psiankowatych (*Solanaceae*) oraz z rodziny powojowatych (*Convolvulaceae*), opisując zawarte w nich alkaloidy halucynogenne, ich aktywność biologiczną oraz obszar zastosowania w medycynie. Dodatkowo, w Tab. 1.1 oraz 1.2 wyszczególniono i scharakteryzowano leki, dostępne na polskim rynku, zawierające poszczególne alkaloidy. Rozdział drugi, najobszerniejszy, zawiera kompendium wiedzy z zakresu sposobów przygotowywania próbek roślinnych do analizy jakościowej i ilościowej. Doktorantka opisała tutaj między innymi podstawy teoretyczne technik ekstrakcji rozpuszczalnikowej wspomaganej ultradźwiękami oraz promieniowaniem mikrofalowym, jako te najczęściej stosowane w etapie izolacji alkaloidów stanowiących przedmiot badań niniejszej dysertacja. Zwłaszcza przydatna jest tutaj Tab. 2.1, w której Autorka przedstawiła zestawienie i porównanie metod UAE stosowanych do ekstrakcji alkaloidów tropanowych z roślin *Solanaceae*. Rozumiem, że brak takiego zestawienie tabelarycznego

dla techniki MAE wynika z niewielkiej liczby doniesień literaturowych z tego zakresu tematycznego, chociaż nie ukrywam, że dla pewnych porównań (choćby praco – i czasochłonności stosowanych metod) takie zestawienie byłoby wygodniejsze dla czytelnika. niż opis w formie jednolitego tekstu – ale jest to sprawa jak najbardziej dyskusyjna. W tym samym rozdziale zostały również opisane techniki ekstrakcyjne stosowane w etapie oczyszczania ekstraktów roślinnych. Natomiast w rozdziale trzecim scharakteryzowano techniki oznaczania alkaloidów tropanowych i alkaloidów sporyszu, koncentrując się w głównej mierze na metodach analitycznych używanych przez doktorantkę również w swoich badaniach (GC oraz CE). Całość części literaturowej zamyka, charakteryzujący się dużą fachowością i wnikliwością, opis metod chemometrycznych umożliwiających między innymi różnicowanie badanych roślin *Solanacea* ze względu na gatunek i wiek oraz przewidywanie optymalnych parametrów procesu przygotowania próbek.

Na podkreślenie zasługuje bogaty materiał źródłowy, z jakim Doktorantka zdołała się zapoznać i go przestudiować. Łącznie dysertacja obejmuje 243 odnośniki literaturowe, z czego 75% stanowią prace opublikowane w recenzowanych czasopismach naukowych. Aczkolwiek, kwestią dyskusyjną jest cytowanie licznych pozycji literaturowych pochodzących z ubiegłego wieku (ponad 40 odnośników). Jakkolwiek całość części literaturowej, płynnie wprowadza czytelnika, zarówno w tematykę pracy oraz jasno i rzeczowo nawiązuje do planowanych badań eksperymentalnych.

Drugą część przedłożonej pracy doktorskiej stanowi obszerna „Część doświadczalna” w której na początku wyszczególniono cel pracy oraz zawarto opis stosowanych odczynników i materiałów, scharakteryzowano surowiec badawczy – badany materiał roślinny oraz stosowaną aparaturę. Istotnym elementem części doświadczalnej są rozdziały 9, 10, 11 i 12 w których Pani mgr Monika Ciechomska przedstawiła i skomentowała wyniki swoich badań podzielone na kilka etapów. W pierwszym etapie opracowała metodę analityczną do oznaczania alkaloidów tropanowych w wybranych gatunkach roślin psiankowatych z wykorzystaniem techniki MAE oraz QuEChERS, a do optymalizacji warunków oczyszczania ekstraktów z pozostałych składników matrycy oraz analizy dyskryminacyjnej użyto metod chemometrycznych. W drugim, te same substancje Doktorantka analizowała stosując w etapie przygotowania próbki ekstrakcję rozpuszczalnikową wspomaganą ultradźwiękami oraz technikę QuEChERS. W obu przypadkach do oznaczeń końcowych użyto chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS), i w obu przypadkach opracowane metody zostały poddane walidacji. W trzecim etapie Doktorantka skoncentrowała uwagę na opracowaniu uniwersalnej metody analizy i identyfikacji materiału roślinnego pod kątem jednoczesnego oznaczania alkaloidów tropanowych i sporyszu z zastosowaniem techniki UAE i CE-MS. Całość zamyka podsumowanie badań.

Należy podkreślić że praca jest napisana starannie, a Autorka posługuje się zrozumiałym i łatwym w odbiorze językiem. Opinia ta dotyczy zarówno przejrzystości opisu eksperymentów, poprawnego przeglądu aktualnego stanu wiedzy, zasadności wyciąganych wniosków, ale również szaty graficznej. Uważna lektura opracowania ujawnia niewielką liczbę błędów literowych i edytorskich oraz drobnych nieścisłości, co w przypadku tak obszernej pracy zasługuje na podkreślenie. Stosowana nomenklatura jest zgodna z wytycznymi dla dziedziny, a zamieszczone rysunki i tabele są dość czytelne, opatrzone w większości poprawnymi i wyczerpującymi podpisami.

Uwagi ogólne:

1. Brak konsekwencji w wykazie skrótów użytych w pracy, gdyż niestety nie wszystkie objaśnienia z zastosowanych w dysertacji symboli zostały umieszczone w wykazie (pominięto między innymi skróty: LLE, SDS, SFMAE, LSA). Z przyczyn nieznanych skrót GCB, pomimo zastosowanego wykazu alfabetycznego pojawia się pomiędzy literami „B” i „C”.
2. Czy sformułowanie „rośliny te nie są substancjami objętymi...” jest rzeczywiście trafne? (str. 14)
3. Na str. 30 pojawia się informacja kierująca czytelnika do rozdziału 0, którego nie ma: cytuję „Szczegóły dotyczące parametrów walidacyjnych tych metod zamieszczono w rozdziale 0”
4. Czy aby na pewno sformułowanie „30 minut maceracji .....pozwoliło na uzyskanie 9% większych stężeń alkaloidów” jest prawidłowe (str. 31)? Czy zwiększa się stężenie analitów czy raczej wydajność i efektywność stosowanych procedur izolacji badanych alkaloidów?
5. Str. 53 „atropina nie ulegała praktycznie elucji na kolumnkach C18” - elucja zdecydowanie powinna być z kolumnek, a nie na kolumnkach!
6. W wykazie aparatury nie uwzględniono spektrofotometru używanego w pomiarach chlorofilu.
7. Który z rysunków przedstawionych na stronie 107 odnosi się do skopolaminy?
8. Przedostatnie zdanie na stronie 109 jest niejasne, proszę o jego korektę. W tym miejscu nasuwa się pytanie których części? Jaki był procent prawdopodobieństwa jeśli chodzi o porównanie otrzymanych widm z widmami dostępnymi w bibliotece.
9. Na Rys. 9.8 przedstawiono chromatogramy uzyskany z analizy ekstraktów liści *D. stramonium* oczyszczanych z użyciem sorbentu Z-Sep+. Które piki na chromatogramie odpowiadają analizowanemu związkowi?
10. Na stronie 117 opisane w tekście ilości sorbentów użyte w etapie oczyszczania nie korelują z wynikami widocznymi na Rys. 9.10, 9.11, 9.12.

11. Analizując Rys. 9.15, w odniesieniu do próbek nasion *D. metel*, z czego może wynikać brak istotnych różnic w stężeniu analitów, obecnych w badanych ekstraktach, w zależności od zastosowanej masy próbki.
12. Rys. 9.22 jest mało czytelny - szczególnie dotyczy to chromatogramów otrzymanych w trybie SIM (oznaczonych kolorem czerwonym).
13. W Tab. 9.8 brakuje parametrów walidacyjnych związanych z powtarzalnością i precyzją pośrednią.
14. Na stronie 117, podany jest odnośnik literaturowy [117] i opisany jakoby była to praca Nowak i wsp., ale pozycja 117 jest monoautorska.
15. W części dotyczącej opracowywania metody UAE/CE-MS brakuje przykładowego elektroferogramu z analizy ekstraktu próbki rzeczywistej
16. Czy w trakcie optymalizacji metody CE-MS zmiana parametrów takich jak średnica kapilary mogłaby wpłynąć znacząco na rozdzielczość?
17. Na stronie 202 proszę o wyjaśnienie czy aby na pewno metanol ma zdolność „przesuwania” wartości pKa.
18. Ostatnią uwagą jest kwestia braku informacji składających się na dorobek naukowy Doktorantki.

Powyższe uchybienia nie wpływają jednak w mojej opinii na ogólną bardzo wysoką ocenę pracy. Uważam, że na szczególne uznanie zasługuje zakres przeprowadzonych badań oraz trafność doboru technik i procedur badawczych. Godnymi podkreślenia są także konsekwencja w przeprowadzaniu zaplanowanych eksperymentów, a także odpowiednia interpretacja wyników, rzeczowa dyskusja i trafne formułowanie wniosków. Doktorantka zrealizowała bardzo ambitny program badań, a do najważniejszych osiągnięć przedłożonej do oceny pracy doktorskiej należą:

- ✓ opracowanie wiarygodnych procedur analitycznych opartych o techniki MAE i UAE oraz technikę QuEChERS i GC-MS, które umożliwiają efektywne oznaczanie atropiny i skopolaminy w liściach i nasionach *D. metel* oraz liściach *B. pittieri*.
- ✓ Szczególnie istotne było opracowanie uniwersalnej metody MEA dla liści, zwłaszcza w odniesieniu do analizy jakościowej śladowych ilości materiału roślinnego na potrzeby opiniowania sądowego.
- ✓ Interesującym i innowacyjnym podejściem, w przedłożonej pracy doktorskiej jest opracowanie nowatorskiej procedury matematycznej o nazwie „*purity index*” umożliwiającej ocenę stopnia oczyszczenia ekstraktów testowanych roślin.



- ✓ Pionierskie zastosowanie metod chemometrycznych – analizy składowych głównych (PCA) i analizy skupień (CA) do różnicowania badanych próbek liści i nasion roślin *Solanacea*, pod względem gatunku, miejsca występowania oraz stadium rozwoju (wiek rośliny);
- ✓ Opracowanie metody UAE/CE-MS do oznaczania alkaloidów tropanowych i sporyszu w dostępnym materiale roślinnym, jako uniwersalnej procedury postępowania z nieznanym materiałem roślinnym pochodzącym z liści lub nasion *Solanaceae* i *Ipomoea*

Lektura pracy jednoznacznie wskazuje, że Autorka jest dobrze przygotowana do samodzielnego prowadzenia badań, a przedstawiona do oceny praca stanowi przykład ciekawego i oryginalnego rozwiązania problemu naukowego. Opisane w dysertacji badania i wyciągnięte na ich podstawie wnioski stanowią istotny wkład w rozwój analityki związków z grupy alkaloidów tropanowych i sporyszu w zróżnicowanym materiale roślinnym. Biorąc pod uwagę powyższe fakty można stwierdzić, że założony przez Doktorantkę cel pracy został w pełni zrealizowany. Uzyskane wyniki zostały również w części opublikowane, w co najmniej dwóch pracach z listy filadelfijskiej.

W podsumowaniu stwierdzam, że cel postawiony przed podjęciem badań został osiągnięty, a przedstawiona mi do recenzji praca „*Nowoczesne analityczne techniki badania związków psychoaktywnych i trujących w popularnych roślinach ozdobnych*” spełnia kryteria stawiane rozprawom doktorskim przez stosowną ustawę (Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku; Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.). Wnoszę zatem o dopuszczenie mgr Moniki Ciechomskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Przedstawione uwagi nie umniejszają wartości naukowej rozprawy doktorskiej. Praca charakteryzuje się wysoką, potencjalną wartością aplikacyjną przedstawionych w rozprawie doktorskiej rozwiązań, zawiera liczne elementy nowości naukowej, a wymienione uwagi/pytania nie umniejszają mojej wysokiej oceny recenzowanej pracy. Przedstawione wyniki badań świadczą również o umiejętności rozwiązywania problemów metodologicznych i doświadczalnych przez Doktorantkę. Napisana przez Panią mgr Monikę Ciechomską rozprawa potwierdza, że posiada Ona wiedzę i umiejętności wymagane dla doktora nauk chemicznych. Wobec powyższego wnioskuję o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

#### **Wyróżnienie rozprawy doktorskiej**

Mając na uwadze wysoki poziom badań wchodzących w skład recenzowanej pracy doktorskiej oraz fakt, że znaczna część wyników została opublikowana w renomowanych czasopismach z listy JCR - co

stanowi niewątpliwe niezależne potwierdzenie ważności wybranej tematyki badawczej - wnosząc o jej wyróżnienie w sposób przewidziany regulaminem Uczelni.

*Polina Lina*

