

Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES

Instytut Ekspertyz Sądowych
im. prof. dra Jana Sehna
w Krakowie

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Julii Nowak pt.

***Opracowanie nowych metod identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych
w roślinach dla potrzeb opiniowania sądowego***

Charakterystyka i znaczenie podjętej problematyki badawczej

Przedmiotem badań opisanych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Julii Nowak były rośliny zawierające substancje psychoaktywne. Jak Doktorantka wskazała we „Wstępie”, ze względu na restrykcyjną politykę antynarkotykową oraz rosnącą popularność środków pochodzenia roślinnego w stosunku do substancji syntetycznych (również obserwowaną np. w przemyśle farmaceutycznym przy produkcji leków czy tzw. suplementów diety), osoby zamierzające się odurzyć coraz częściej sięgają po „narkotyki alternatywne”, określane ustawowo jako „środki zastępcze”. Jednym z rodzajów takich środków są rośliny powszechnie dostępne w różnych postaciach, najczęściej przyjmowane poprzez zjedanie nasion, wypijanie wywarów z liści czy ich palenie w sposób analogiczny jak w przypadku najpopularniejszego kontrolowanego środka odurzającego, czyli zieleń konopi innych niż włókniste, zwanego popularnie marihuaną.

Rośliny zawierające związki psychoaktywne były wykorzystywane w celach rytualnych i medycznych od tysięcy lat, jednak obecna „moda” na przyjmowanie środków takiego pochodzenia jest przyczyną dużej liczby zatruc oraz innych zdarzeń niebezpiecznych dla zdrowia i życia. Z tego względu bardzo ważne jest pogłębianie wiedzy na temat substancji zawartych w roślinach przyjmowanych przez „psychonautów”, ustalanie stężenia tych związków, określanie stopnia zgodności składu między różnymi nasionami czy poszczególnymi częściami rośliny, a także między roślinami, ich odmianami. Istotne jest również ustalanie sposobów przyjmowania takich środków do organizmu, mechanizmów ich

działania czy występowania potencjalnych interakcji, a także wyznaczanie stężeń występujących we krwi i innych płynach ustrojowych i narządach. Aby było to możliwe, konieczne jest opracowanie właściwych metod analitycznych, które pozwolą na jednoznaczną identyfikację i oznaczenie substancji psychoaktywnych zawartych w roślinach. Informacje uzyskane w wyniku takich badań mogą być wykorzystane z kolei do opracowania metod oznaczania tych substancji w materiale biologicznym. W niektórych przypadkach, gdy nie jest możliwe oznaczenie substancji psychoaktywnych w płynach ustrojowych, ustalenie rodzaju przyjętej rośliny na podstawie analizy śladów pozostawionych na miejscu zdarzenia, jak to zaproponowała Autorka pracy w rozdziałach 11.5.2 i 12.5.3, może być również bardzo pomocne w diagnostyce zatrucia.

Należy również wziąć pod uwagę, że przy obecnie obowiązującej definicji ustawowej środka zastępczego jako „produktu zawierającego co najmniej jedną nową substancję psychoaktywną lub inną substancję o podobnym działaniu na ośrodkowy układ nerwowy, który może być użyty zamiast środka odurzającego lub substancji psychotropowej lub w takich samych celach jak środek odurzający lub substancja psychotropowa”, produkty zawierające rośliny, w skład których wchodzi substancje psychoaktywne mogą być uznane za środki zastępcze, których wytwarzanie lub wprowadzanie do obrotu jest zabronione. W podobnym kontekście można rozpatrywać analizy chemometryczne wykonane przez Doktorantkę w celu określenia rodzaju nasion wilców dostępnych na polskim rynku oraz ustalenia podobieństwa pomiędzy dwiema próbkami nasion. Zatem opracowane przez Doktorantkę metody analityczne mogą znaleźć zastosowanie w laboratoriach kryminalistycznych, gdy celem badań będzie ustalenie rodzaju rośliny i zawartych w niej substancji psychoaktywnych.

Celem recenzowanej pracy było opracowanie metod identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych zawartych w roślinach, które nie znajdują się na liście środków odurzających, a które są stosowane jako zamienniki substancji kontrolowanych, tj. nasionach bielunia (*Datura*) i brugmansji (*Brugmansia*), orzechach muszkatołowca korzennego (*Myristica fragrans*), oraz nasionach wilców (*Ipomoea*). Badanie próbek materiału roślinnego w celu identyfikacji i oznaczenia składników psychoaktywnych jest dużym wyzwaniem dla chemików analityków z uwagi na ich bardzo złożoną matrycę, która często istotnie zakłóca proces ekstrakcji i analizę instrumentalną. Doktorantka podczas badań zwróciła uwagę na problem niejednorodności materiału badawczego, w tym duże zróżnicowanie stężeń analitów w materiale roślinnym, przedstawiając jednocześnie sposoby na ograniczanie wpływu tych zaburzeń na wyniki analityczne czy proponując odpowiednie pobieranie próbek reprezentatywnych. Przeanalizowała również mechanizmy oddziaływania na materiał roślinny

stosowanych w ramach badań nowoczesnych metod ekstrakcji, tj. działania na próbki mikrofalami oraz ultradźwiękami. Innym istotnym zagadnieniem poruszonym w pracy była możliwość rozpadu lub tworzenia się analitów oraz ich pochodnych na różnych etapach procesu analitycznego i wpływu tych procesów na wynik analizy. Twórczą analizę wymienionych czynników, dokonaną przez Autorkę pracy, należy uznać za istotny wkład w rozwój chemii analitycznej.

Układ pracy, struktura podziału treści i poruszane zagadnienia

Praca liczy 153 karty, z których 53 zajmuje wprowadzenie do tematyki badań. Uzupełnia ją 9 stron suplementów. Praca została podzielona na 13 rozdziałów, zawierających teoretyczne podstawy przeprowadzonych badań oraz omówienie wyników doświadczalnych, jak również wykaz skrótów używanych w pracy, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz literatury. Konstrukcję pracy należy uznać za właściwą.

Część wstępna rozprawy zawiera informacje na temat związków psychoaktywnych obecnych w różnych roślinach, obowiązujące rozwiązania ustawowe dotyczące kontroli takich związków i środków, ze wskazaniem problemów interpretacyjnych dotyczących np. zapisów w odniesieniu do nasion roślin z rodzaju wilec, a także analizę przyczyn rosnącej popularności „narkotyków” pochodzenia roślinnego. Bardzo interesujące i nowatorskie jest zestawienie wybranych tematów publikowanych na najpopularniejszych polskich i anglojęzycznych forach internetowych przez użytkowników substancji odurzających. W sposób szczegółowy zostały omówione związki psychoaktywne występujące w roślinach badanych przez Doktorantkę. Autorka pracy zwróciła uwagę, że należą one do różnych grup chemicznych, charakteryzują się odmiennym oddziaływaniem na organizm ludzki i prawdopodobnie mają różny mechanizm działania, albowiem jedynie mechanizm działania alkaloidów tropanowych został dotychczas dobrze zbadany i opisany. Omówiła również sposoby przyjmowania, czas działania poszczególnych preparatów, obserwowane efekty, objawy uboczne, a także typowe wielkości dawek przyjmowane przez użytkowników w celu wywołania efektu odurzenia oraz powodujące wystąpienie efektów toksycznych. Autorka pracy zwróciła uwagę na zagrożenia związane z przyjmowaniem preparatów roślinnych o nieznanym składzie jakościowym i ilościowym.

Część teoretyczna zawiera również szerokie omówienie procedur stosowanych do przygotowania próbek materiału roślinnego do analiz za pomocą metod instrumentalnych.

Z uwagi na złożony charakter takiej matrycy, dużą liczbę zawartych związków wykazujących zbliżone właściwości fizyczne i chemiczne, a także małą powtarzalność składu, stanowią one duże wyzwanie dla chemików analityków. Doktorantka wskazała, że w takim przypadku konieczne jest stosowanie selektywnych metod izolacji analitów oraz ich zagęszczanie. Mimo to wciąż w praktyce często wykorzystywane są klasyczne metody jak maceracja czy ekstrakcja pod chłodnicą zwrotną i z użyciem aparatu Soxhleta, niemniej jednak standardem jest obecnie ekstrakcja ciecz-ciecz, a także ekstrakcja do fazy stałej. Nowoczesne techniki przygotowania próbek obejmują m.in. ekstrakcję cieczą w stanie nadkrytycznym (SFE) ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami (UAE) czy ekstrakcję wspomaganą mikrofalami (MAE). Te dwie ostatnie zostały zastosowane przez Doktorantkę w badaniach, będących podstawą recenzowanej pracy.

Wśród metod analitycznych stosowanych do analizy materiałów pochodzenia roślinnego dominują techniki sprzężone. Zwykle jest to połączenie techniki separacyjnej typu chromatografia gazowa (GC) lub cieczowa (LC), względnie elektroforeza kapilarna (CE), ze spektrometrią mas (MS). Najpopularniejsze w laboratoriach kryminalistycznych jest połączenie GC-MS, które pozwala na identyfikację substancji na podstawie widm masowych oraz porównanie względnych czasów retencji, jak również oznaczenie analitów. Niekiedy w celu poprawy właściwości analitycznych konieczne jest przeprowadzenie związków w pochodne, czyli wykonanie derywatywacji. Z kolei do identyfikacji nowych związków bardzo dobrym narzędziem analitycznym jest chromatografia cieczowa z tandemowym spektrometrem mas z analizatorami: kwadrupolowym i czasu przelotu (LC-QTOFMS). Powyższe metody zostały zastosowane w badaniach eksperymentalnych przez Doktorantkę i omówione w części wstępnej rozprawy.

Omówienie części doświadczalnej rozpoczyna się od określenia celu pracy, a następnie opisane zostały materiały i sprzęt laboratoryjny stosowany w badaniach, metodyka badań, po czym przedstawiono wyniki, omówiono i podsumowano oddzielnie trzy niezależne części badań. Pracę kończą wnioski, które wyciągnięto na podstawie uzyskanych wyników i zebranych doświadczeń.

Rozprawa zawiera również wykaz skrótów. W pracy znajduje się aż 154 odnośniki literaturowe (oraz do stron internetowych), co świadczy o szerokim rozeznaniu tematyki badawczej przez Doktorantkę. Dobór pozycji literaturowych jest odpowiedni do poruszanej tematyki.

Praca napisana jest w sposób bardzo staranny. Należy podkreślić dbałość Doktorantki o formę graficzną pracy oraz stosowane słownictwo. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej tematyce naukowej. Jest to trudne, ponieważ do języka polskiego przenikają obce, głównie angielskie sformułowania, a dodatkowo wiele pojęć czy nazw technik pomiarowych nie doczekało się oficjalnych polskich odpowiedników. Dzięki temu pracę czytało się z przyjemnością i zainteresowaniem.

Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników

Recenzowana praca miała charakter eksperymentalny. W mojej ocenie, badania zostały zaplanowane we właściwy sposób, a dobór analitów, rodzaju eksperymentów oraz aparatury badawczej, jak również sposób przeprowadzenia badań oraz analiza uzyskanych wyników były odpowiednie.

W pracy przedstawione zostały wyniki badań materiału roślinnego trzech rodzajów roślin, tj. nasion i liści roślin bielunia i brugmansji, nasion muszkatowca korzennego oraz nasion roślin z rodzaju wilec. Wyniki przedstawiono i omówiono w oddzielnych rozdziałach dla poszczególnych rodzajów roślin, co ułatwiło ich analizę.

W pierwszej kolejności zaprezentowano opracowanie metody przygotowania próbek nasion i liści roślin z rodziny psiankowatych z wykorzystaniem ekstrakcji wspomaganiej mikrofalami (MAE) oraz badania uzyskanych ekstraktów za pomocą metod GC-MS i LC-MS. Do optymalizacji warunków ekstrakcji wykorzystano plan wg Doehlerta, niezależnie dla nasion i liści bielunia oraz liści brugmansji. Ustalono, że optymalne warunki ekstrakcji są zależne od części rośliny, a nie jej rodzaju, tzn. liście różnych roślin wymagają zastosowania zbliżonych warunków ekstrakcji, natomiast nasiona wymagają użycia wyższej temperatury podczas ekstrakcji. Dla metody GC-MS uzyskano niskie wartości granicy wykrywalności (LOD) oraz szeroki zakres liniowości, co sprawiło, że możliwe było zastosowanie opracowanej metody do badania próbek rzeczywistych roślin bielunia i brugmansji pod kątem zawartości w nich atropiny i skopolaminy. Niska precyzja oznaczeń sprawiła, że Autorka pracy uznała, iż metoda jest wystarczająca do przeprowadzenia jedynie półilościowej analizy tych związków. Doktorantka zoptymalizowała również metodę LC-MS pod kątem identyfikacji wymienionych alkaloidów tropanowych w ekstraktach próbek bielunia i brugmansji. Jako kryteria optymalizacji dla metody chromatograficznej przyjęła dobry rozdział analitów w stosunkowo

krótkim czasie, natomiast warunki pracy spektrometru mas dobrała w ten sposób, aby uzyskać jak największe sygnały analityczne dla atropiny i skopolaminy. Poza wymienionymi analitami Doktorantka wykryła w badanych ekstraktach liści i nasion cztery inne związki, prawdopodobnie również będące alkaloidami tropanowymi, jednak ze względu na niskie stężenie nie była w stanie ich jednoznacznie zidentyfikować.

Metoda GC-MS została również użyta do oznaczeń mirystycyny w próbkach orzecha muszkatołowca korzennego. Doktorantka przetestowała trzy metody przygotowania próbek tej rośliny do analizy, tj. ekstrakcję wspomaganą mikrofalami, a także ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami z wykorzystaniem myjki oraz sonotrody. Opracowane procedury umożliwiły przeprowadzenie analiz ilościowych w próbkach zmielonej gałki muszkatołowej lub kwiatu muszkatołowego z dobrą precyzją. Dalsze, szczegółowe badania przeprowadzone przez Doktorantkę, m.in. z użyciem skaningowego mikroskopu elektronowego, wskazały jednak, że ekstrakcja wspomaganą mikrofalami przebiega efektywniej i charakteryzuje się wyższą wydajnością, dlatego ta metoda została uznana za właściwą. Wybrana metoda została użyta do oznaczania mirystycyny oraz identyfikacji innych składników olejku eterycznego gałki muszkatołowej w komercyjnie dostępnych produktach. Autorka pracy zauważyła, że najwyższe stężenia mirystycyny i największa liczba związków występują w próbkach produktów, które są najlepiej oceniane przez osoby używające tej rośliny w celach odurzających. Ponadto Doktorantka wykazała, że opracowana metoda może znaleźć zastosowanie w analizie śladowych ilości gałki muszkatołowej, jaka może pozostać na miejscu zdarzenia.

Do oznaczania erginy i ergometryny oraz identyfikacji innych alkaloidów sporyszu w próbkach nasion wilców Doktorantka zastosowała opracowaną, zoptymalizowaną i zwalidowaną metodę LC-MS, przy czym do przygotowania próbek wykorzystwała w tym przypadku ekstrakcję wspomaganą ultradźwiękami z wykorzystaniem myjki. Przy opracowaniu metody ekstrakcji Doktorantka zwróciła uwagę na negatywny wpływ ekstrakcji mikrofalowej oraz wysokiej temperatury na przekształcanie się LSH w erginę i wskazała na konieczność zapewnienia łagodnych warunków w analizie alkaloidów sporyszu. W ramach pracy Doktorantka przetestowała również możliwość zatężania ekstraktów próbek śladowych z wykorzystaniem mikroekstrakcji na porowatym sorbencie (technika MEPS), co pozwoliło na zwiększenie czułości i identyfikację dodatkowych alkaloidów występujących w nasionach w niskich stężeniach. Zoptymalizowana metoda UAE/LC-MS charakteryzowała się niskimi granicami wykrywalności i oznaczalności oraz szerokim zakresem liniowości, co pozwoliło na badanie próbek roślin, a także ich śladów. Doktorantka przeanalizowała próbki nasion

pochodzące od 12 producentów, zakupione w różnych miejscach. Wyniki badań wskazały na duże różnice w stężeniach alkaloidów sporyszu w nasionach, co stanowi niebezpieczeństwo dla osób przyjmujących takie nasiona w celach odurzających. Autorka pracy podjęła również próbę opracowania metody klasyfikacji nasion, stosując w tym celu różne narzędzia chemometryczne. Przy użyciu danych analitycznych z badania ekstraktów metodą LC-MS, za pomocą aglomeracyjnej hierarchicznej analizy skupień, z wykorzystaniem kryterium Mojeny do podziału próbek na grupy, udało jej się poprawnie przyporządkować reprezentatywne próbki nasion w 97% przypadków.

Recenzowana praca zawiera istotne elementy nowości. Do przygotowania próbek do badań wykorzystywane były nowoczesne rodzaje ekstrakcji, takie jak ekstrakcja wspomaganą mikrofalami lub ultradźwiękami, a zastosowane metody instrumentalne należy uznać za właściwe. Optymalizacja warunków ekstrakcji, rozdziału chromatograficznego oraz pracy spektrometrów pozwoliła na uzyskanie niskich granic oznaczalności, szerokich zakresów liniowości, a także wysokiej selektywności uzyskanych wyników. Dzięki temu możliwe było wykrycie nowych związków w badanych próbkach roślinnych, a także oznaczenie głównych składników psychoaktywnych.

Przy wyborze procedur przygotowania próbek do badań Doktorantka zwracała uwagę na aspekt praktyczny, wyrażający się prostotą wykonywanych czynności, krótkim czasem procedury analitycznej czy zużywaniem niewielkich ilości rozpuszczalników. To istotne elementy tzw. zielonej chemii, będącej ważnym elementem rozwoju chemii analitycznej. Wyraża się ona dbałością zarówno o środowisko naturalne, jak i analityka. Wszystkie procedury zaproponowane w pracy należy uznać za przyjazne środowisku i analitykowi.

Recenzowana praca jest jednym z szerszych eksperymentalnych opracowań dotyczących substancji psychoaktywnych zawartych w roślinach przyjmowanych w celach odurzających i stanowi cenne źródło informacji dla biegłych sądowych opiniujących w tym zakresie.

Uwagi szczególne

Wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Julii Nowak oceniam jako bardzo dobrą. Niezależnie od tej oceny, mam kilka uwag do treści pracy, które przedstawiłem poniżej.

1. Mam wątpliwości jak Autorka pracy rozumie pojęcie „walidacja metody analitycznej”. Doktorantka sprawdziła ten proces w niektórych częściach pracy do określania precyzji (precyzji pośredniej i odtwarzalności) oraz odzysku. Najprostsza definicja walidacji to jednak „wykazanie, że metoda właściwa do zamierzonego celu”. W niektórych przypadkach, np. przy zastosowaniu ekstrakcji z użyciem ultradźwięków analiza próbek rzeczywistych gałki muszkatolowej wykazała, że nie cała ilość analitu była ekstrahowana, więc można mieć wątpliwości czy rzeczywiście była to metoda właściwa do zamierzonego celu. Moje wątpliwości wzbudza również liczba metod zwalidowanych przez Doktorantkę, ponieważ jest to niespójnie przedstawiane w pracy. Dla przykładu, w „Celu pracy” Doktorantka podała, że walidacji poddane będą jedynie metody ilościowe, a w Rozdziale 11.4 (str. 91) podano, że „w celu doboru optymalnej metody badania próbek muszkatolowca korzennego, przeprowadzono walidację wszystkich trzech opracowanych metod ekstrakcji i metody GC-MS”. Co zatem było poddawane walidacji w ramach pracy?
2. Jeszcze większe wątpliwości wzbudza podejście Autorki do dokładności metody. W „Celu pracy” znajduje się sformułowanie, że metody mogące znaleźć zastosowanie w opiniowaniu sądowym powinny wymagać jak najmniejszej ilości próbki oraz umożliwiać jednoznaczną identyfikację analitów, jak również ich oznaczenie z dużą dokładnością. Natomiast w Rozdziale 9.3 „Walidacja metod analitycznych” (str. 60) Autorka pracy podała, że „w związku z brakiem dostępu do próbek ślepych oraz materiałów odniesienia, w celu walidacji metod analitycznych opisanych w pracy nie oceniano dokładności metody analitycznej”. Czy zatem, w ocenie Doktorantki, opracowane metody są mogące znaleźć zastosowanie w opiniowaniu sądowym?
3. Granice wykrywalności i oznaczalności (LOD i LOQ) obliczono m.in. na podstawie odchylenia standardowego sygnału dla roztworu wzorcowego o najniższym stężeniu analitów i współczynnika nachylenia krzywej kalibracyjnej. Rodzi się pytanie, jak mają się tak wyznaczone wartości granic do ustalania zawartości związków w materiale roślinnym?
4. Przy definiowaniu odzysku (str. 61) Autorka pracy podała, że „A” i „B” to odpowiednia „różnica sygnału”. Czy to oznacza, że odejmowano odpowiednie pola powierzchni pod pasmami chromatograficznymi? Czy jest to autorskie podejście Doktorantki czy też oparła się Pani o jakieś przewodniki czy publikacje? Czy stosowane przez Autorkę w całej rozprawie określenie „pasma chromatograficzne” to obecnie oficjalna, prawidłowa nazwa „piku chromatograficznego”?
5. W rozdziale 10.4 przedstawiono wyniki badań nasion roślin z gatunku Datura i Brugmansia metodą GC-MS i stwierdzono, że można ją potraktować jako półilościową,

- tj. umożliwiającą oszacowanie zawartości analitów w próbkach naturalnych, ale nie precyzyjne ich oznaczenie. Czy sprawdzono na ile problemem niskiej precyzji wynikał z niejednorodności materiału, a na ile z niskiej precyzji pracy chromatografu?
6. W pracy nie określono jednoznacznie, kiedy metoda jest ilościowa, kiedy półilościowa, a kiedy wyłącznie jakościowa. Dla przykładu, w rozdziale 10.5 (str. 78) Autorka pracy podała, że „W nasionach oraz liściach bielunia zidentyfikowano atropinę i skopolaminę. Nie przeprowadzono analizy ilościowej, jednak proporcje tych składników były analogiczne jak te ustalone w badaniach GC-MS”, natomiast w kolejnym rozdziale 10.6, czyli „Podsumowaniu” (str. 83) znajduje się zdanie: „Badanie próbek rzeczywistych zoptymalizowaną metodą LC-MS dało podobne wyniki ilościowe jak badania przeprowadzone metodą GC-MS”. Zatem czy była przeprowadzana analiza ilościowa, czy też nie? W rozdziale 12.4 znajduje się zdanie: „Ponieważ parametry te odpowiadają zakresowi stężeń analitu w próbach nasion, metoda mogła zostać wykorzystana do półilościowego oznaczania lizergolu.” Dlaczego w tym przypadku uznano, że metoda jest jedynie „półilościowa”?
 7. Na rycinie 18 uwagę zwraca „ogonowanie” pasma od kofeiny, czyli wzorca wewnętrznego. Czy Doktorantka sprawdzała precyzję bez uwzględniania wzorca wewnętrznego w obliczeniach?
 8. W pracy nie podano, jakie kryteria przyjmowano jako warunek identyfikacji substancji. Ile jonów brano pod uwagę? Dla którego najbardziej intensywnego jonu liczone wartości granic oznaczalności i wykrywalności? Ma to szczególne znaczenie w kontekście rozważań przedstawionych w rozdziale 12.5.3, czyli dotyczących badania śladów nasion.
 9. W rozdziale 11.2 (str. 85) podano wśród optymalizowanych parameterów rodzaj wzorca wewnętrznego, ale za kryterium optymalizacji przyjęto jak największą wydajność ekstrakcji mirystycyny. Dopiero w dalszej części wyjaśniono prawidłowo, że kluczowym parametrem było w tym przypadku właściwe zachowanie się wzorca wewnętrznego podczas procesu ekstrakcji.
 10. W rozdziale 12.2 (str. 106) podano, że celem optymalizacji było osiągnięcie maksymalnego stężenia erginy i ergometryny w ekstraktach, mierzonego jako stosunek pola powierzchni pasma chromatograficznego analitu do wzorca. Kiedy dodawano wzorzec i jak wpływało to na obliczoną wydajność ekstrakcji?
 11. Dla recenzenta nie jest jasne, jakie dane zostały wykorzystane do rozróżniania próbek za pomocą analizy skupień (rozdział 12.5.4) i czy w sposób należyty przygotowano te dane do analizy chemometrycznej. Czy Doktorantka sprawdzała zgodność czasów retencji dla

zidentyfikowanych substancji i czy zastosowano jakąś metodę eliminacji przesunięć pików chromatograficznych spowodowaną niestabilnością warunków analizy? Czy kryteria wykrycia związku nie były zbyt łagodne, skoro wykryto około 300 potencjalnych związków, ale zdecydowana większość z nich była obecna w pojedynczych próbkach? Czy abundancja przy określonej wartości czasu retencji jest właściwą miarą zawartości substancji w próbce?

Niezrozumiałe dla recenzenta jest również to, że większa część rozdziału „Cel pracy” napisana jest w czasie przyszłym, jakby to był plan pracy („Opracowanie wyżej wymienionych metod będzie składać się z”, „I tak planuje się”, „Otrzymane wyniki zostaną użyte”). Zwróciłem również uwagę, że na rycinie 26 (str. 68) brak jest chromatogramu dla roztworów wzorcowych atropiny i skopolaminy, poddanych derywatywacji w 25°C. Ponadto wykaz skrótów zawiera szereg błędów i odbiega w tym zakresie od bardzo wysokich standardów pracy (np. zarówno EI jak i ESI zostały identycznie zdefiniowane jako „źródło jonów typu elektrozpylanie”, co więcej oba skróty dotyczą dwóch rodzajów jonizacji a nie źródeł, czy też pomyłone zostały skróty i nazwy pochodnych).

Wskazane powyżej wątpliwości i uwagi nie obniżają istotnie wartości pracy, która jak podałem powyżej, jest w mojej ocenie bardzo wysoka.

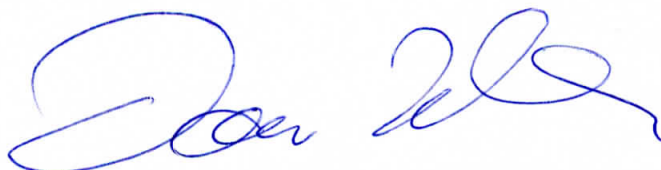
Podsumowanie

Treść rozprawy doktorskiej potwierdza, że Pani mgr Julia Nowak posiada dużą wiedzę na temat substancji psychoaktywnych zawartych w roślinach, bardzo dobry warsztat analityczny, potrafi właściwie zaplanować i przeprowadzić badania oraz zinterpretować uzyskane wyniki. W sposób właściwy odniosła wyniki badań własnych do danych literaturowych oraz przedstawianych w „nowych mediach”. Zaproponowała nowatorskie rozwiązania procesu przygotowania próbek materiału roślinnego do badań. W sposób umiętny dobrała aparaturę badawczą i zoptymalizowała warunki prowadzenia procesów. W sposób dociekliwy analizowała uzyskane wyniki i starała się dochodzić do źródeł niejasności. Rozprawa doktorska Pani mgr Julii Nowak zawiera wiele elementów nowości, do których poza typowymi elementami z zakresu chemii analitycznej omówionymi powyżej zaliczyć można m.in. zaproponowanie ścieżek fragmentacji alkaloidów sporyszu pod wpływem jonizacji poprzez rozpylanie w polu elektrycznym.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej stwierdzam, że spełnia ona wymagania ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2003 nr 65 poz. 595, z późn. zm.) i stawiam wniosek do Rady Naukowej Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Pani mgr Julii Nowak do publicznej obrony.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę poziom naukowy i jakość rozprawy doktorskiej, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej Pani mgr Julii Nowak.



Kraków, dnia 8 czerwca 2018 roku