

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Marty Gil

p.t.: „Wpływ metody przygotowania próbki na ocenę zawartości wybranych metabolitów wtórnych w materiale roślinnym” wykonanej pod kierunkiem

Dr hab. Doroty Wianowskiej, prof. UMCS.

Katedra i Zakład
Chemii

41-808, Zabrze,
ul. Henryka Jordana
19
www.sum.edu.pl

KIEROWNIK KATEDRY
Prof. dr hab.n.med.
i n.o zdr.
Krystyna Tyrpień –
Golder

tel.: (+48 32) 275-51-
88
fax: (+48 32) 275-51-
88

SEKRETARIAT
tel.: (+48 32) 275-51-
88, fax:
(+48 32) 275-51-88,
[rokchemm@sum.edu](mailto:rokchemm@sum.edu.pl)
.pl

Metabolity wtórne (MW) występujące w materiale roślinnym są niskocząsteczkowymi związkami organicznymi o różnorodnej strukturze chemicznej. Wykorzystuje się je w lecznictwie i kosmetologii, a także jako substancje zapachowe i aromatyzujące, barwniki, biopestycydy i dodatki do żywności. W ich powstawanie zaangażowanych jest wiele tysięcy enzymów, stąd ich ilość jest oceniana na kilkadziesiąt, a nawet kilkaset tysięcy. Stężenie metabolitów wtórnych w organizmie roślinnym może zmieniać się w zależności od warunków środowiska, stąd w ich analizie etap przygotowania próbki jest bardzo istotny, a podjęty temat pracy doktorskiej jest jak najbardziej uzasadniony.

Metabolity roślinne pozyskiwane są najczęściej przez ekstrakcję z surowca roślinnego, jednak zawartość tych związków w roślinach jest zazwyczaj zmienna i niska. W związku z tym większym zainteresowaniem cieszą się tzw. techniki ekstrakcji wspomaganej, które skracając czas izolacji, zmniejszają prawdopodobieństwo degradacji metabolitów i sprzyjają dokładniejszej analizie metabolitów wtórnych w badanym materiale. Poza tym brakuje informacji na temat wpływu technik wspomaganej ekstrakcji na stabilność czy też zawartość metabolitów wtórnych w ekstraktach.

Rozprawa jest obszerna i obejmuje 184 strony. W części teoretycznej, która zajmuje 37 stron, Autorka charakteryzuje wybrane podgrupy metabolitów wtórnych i omawia metody ich analizy. W bardzo ciekawy sposób zostały przedstawione dane

na wykresie dotyczącym wykorzystania metod przygotowania próbek do analizy w postaci MSPD/SSDM (dyspersji matrycy do fazy stałej - str. 39).

Cel pracy został sformułowany w odniesieniu do przedstawionych danych z piśmiennictwa we wstępie pracy doktorskiej.

W związku z tym, celem przedstawionej do recenzji pracy było oszacowanie (czemu nie określenie?) specyficznych warunków prowadzenia ekstrakcji wspomaganej na zawartość/stabilność wybranych metabolitów wtórnych.

Dla zrealizowania celu pracy Doktorantka zbadala wpływ różnych metod przygotowania próbek (MASE-ekstrakcja rozpuszczalnikami wspomagana energią mikrofalową, UASE-ekstrakcja z wykorzystaniem ultradźwięków, PLE - ekstrakcja cieczy pod zwiększonym ciśnieniem i SSDM-wariant ekstrakcji z wykorzystaniem dyspersji matrycy do fazy stałej) na zawartość kwasu 5-O-kawoilochoinowego i kwasu 1,3-O-dikawoilochoinowego, resweratrolu oraz kurkuminy w ekstraktach otrzymanych w układach modelowych jako przedstawicieli określonych grup związków oraz w rzeczywistych warunkach ekstrakcji roślin takich jak: zioła krwawnika podbiał, kwiaty wrotyczu pospolitego i rumianku, liście i „serca” karczocha, kwiatostany, ziarna zielonej kawy, winogrona i korzeń ostryżu długiego. Dodatkowym celem pracy było sprawdzenie zastosowania techniki SSDM jako metody odniesienia do odróżniania związków naturalnych od produktów degradacji/transformacji związków macierzystych. Ponadto Autorka postanowiła sprawdzić wpływ matrycy roślinnej, procesu foto transformacji i mieszaniny ekstrakcyjnej na wybrane MW.

W części eksperymentalnej na 17 stronach zostały omówione materiały i metody stosowane w niniejszej pracy, natomiast wyniki przedstawiono w postaci 45 tabel i 60 rysunków, które razem ze stosunkowo skąpą dyskusją zajmują aż 91 stron. Praca obejmuje także streszczenie w języku angielskim i 146 pozycji piśmiennictwa oraz wykaz stosowanych skrótów i skrótów nazw badanych związków chemicznych. Doktorantka zamieściła też wykaz artykułów, na których oparła przedłożoną do recenzji pracę. Podkreślić należy, że prace te są wysoko punktowane, a zostały opublikowane w ostatnich trzech latach przed złożeniem pracy doktorskiej.

Analizując uzyskane wyniki Doktorantka stwierdziła, że na ogół zastosowanie technik wspomaganych do ekstrakcji związków z roślin jest korzystniejsze w porównaniu z technikami konwencjonalnymi, chociaż nawet podczas tych niezbyt długich procedur ulegają one degradacji i przekształceniu w inne związki, które mogą być błędnie traktowane jako nowe naturalne składniki. Autorka podkreśla, że SSDM jest najlepiej sprawdzającą się techniką, ponieważ nie wywołuje żadnej przemiany ani procesów degradacji analizowanych substancji w układach modelowych i w rzeczywistych warunkach ekstrakcji roślin.

Do realizacji pracy Doktorantka wykorzystała wiele metod separacyjnych i technik spektroskopowych, które pozwoliły na zidentyfikowanie wielu struktur będących produktami transformacji lub degradacji związków macierzystych.

Uwagi szczegółowe, które nieco wpływają na obniżenie poziomu tak bardzo pracowitej i czasochłonnej pracy, a wynikają z obowiązku recenzenta, mogłyby też być uwzględnione przy opracowywaniu pracy do druku, są następujące:

W pierwszym akapicie zostały wymienione składniki roślin, jednak nie wspomniano o celulozie (z łac. *cellula* - komórka), która jest składnikiem budulcowym ściany komórkowej roślin.

Na str 11. brakuje grupy OH w kwasie cynamonowym, choć w dalszej części pracy pojawiają się prawidłowe wzory kwasów cynamonowych. To samo dotyczy innych ogólnych struktur związków np. antrachinon podpisany antrachinony, choć brak wzoru ogólnego.

Wymienione na str. 27 metody należą raczej do metod separacyjnych, a nie do migracyjnych.

Niektóre sformułowania są żargonem naukowym np. na str. 28 zamiast „podejść do izolacji” należałoby użyć „procedur izolacji”. Przedostatnie zdanie na tej stronie powinno zaczynać się: W kolejnych podrozdziałach.... a nie poniżej! Str. 33 Zamiast „nie dziwi”, że technika ...można np. powiedzieć „stąd technika ta”.... Str. 68 i 79 widać/nie widać należałoby użyć stwierdzono/nie stwierdzono pików, skoro obecność pików substancji była identyfikowana odpowiednimi detektorami. Str 138 może zamiast na szczołce C18 to użyć na fazie C18., a na str. 144 nie układ tylko po prostu faza ruchoma.

Objaśniając UASE (str 30) dobrze byłoby wyjaśnić nazwę zapożyczoną z języka ang. *sonication* – sonikacja, tym bardziej, że Doktorantka w dalszej części pracy stosuje ten termin. Na str. 36 alkohol też jest rozpuszczalnikiem organicznym, więc można napisać.. alkoholi

i innych rozpuszczalników organicznych. Str. 44 lepiej użyć terminu wzorzec zamiast standard. Oprócz eluenta brak danych na temat warunków przeprowadzania warunków szybkiej chromatografii (str. 45). Str. 49 - piec mikrofalowy jest wyszczególniony szczegółowo w spisie i nie trzeba tego powtarzać. Nasuwa się też pytanie, dlaczego dla wzorca resweratrolu dla PLE jest temp. 125° C, a dla innych wzorców jej nie ma (str. 51. Tabela 1.)?

Doktorantka nie podała jakiego programu statystycznego użyła do oceny uzyskanych wyników (str. 57).

Zgodnie z nomenklaturą chromatograficzną lepiej użyć terminu „procesy rozdzielania” zamiast „rozdziały”. Krzywą kalibracji można zastąpić terminem wykres kalibracyjny, a zamiast upochodnienie można użyć derywatywacja lub przeprowadzenie w pochodną/e str. 101.

W objaśnieniu na str. 56 ESI – powinno być jonizacja poprzez rozpraszanie, a nie działającego w trybie ujemnej polaryzacji, ponadto wyjaśnienie tego sposobu jonizacji w skrótach jest żargonem. Str. 68 i 70 limit rozumiem, że oznacza granic1) wykrywalności.

Przykładowo na str. 69 w opisie rysunku 25, na którym przedstawiono chromatogramy, ale nie wspomniano jaką techniką i w jakich warunkach są one uzyskane. To samo dotyczy rysunków na stronach 74,77, 81, 99, 101, 121, 135 itp. Ponadto uwaga do rys 42 b str. 113 i rys 43 na str. 114 - dla wszystkich chromatogramów - na osi odciętych powinien być nie tyle czas, ale czas retencji/RT [min]. Na str. 119 , 137 i 138 raczej czas retencji, a nie zachowanie retencyjne.

Często używane w recenzowanej pracy i różnie odmieniane słowa **ujawnione** czy **oszacowane** można zastąpić innymi bardziej adekwatnymi terminami np: **zidentyfikowane/analizowane/oznaczone** itp.

Str. 84 tabl. 15 ilości kwasów chlorogenowych podawane w tabelach 15-25 są raczej stężeniami.

Na str. 101 jest błędny nr omawianego rysunku, chociaż na następnej stronie jest on nieco jaśniej opisany niż pozostałe rysunki.

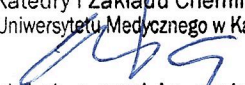
Dlaczego w tytule (str 134) jest LC-MS, a nie LC-MS/MS?

W wykazie skrótów pojawiły się uchybienia np. mM-milimole, podczas gdy, tak przyjęte oznaczenie dotyczy stężenia wyrażonego w mmol/dm³, a także SPME - mikro ekstrakcja do fazy stacjonarnej, a nie na ciełe stałym.

Edycyjnie zwracają uwagę różne rodzaje czcionek: raz kursywą a w innym miejscu inną czcionką np. „we wstępie” str. 7 i 9 czy podpisy pod rysunkami. Poza tym zamiast 30/40-ominutowe powinno być 30/40-minutowe?(np. str. 67) . Str. 55 w układzie, a nie na układzie. Na str. 40 , 42,114,141,147 i w spisie treści pojawiają się literówki i błędy interpunkcyjne. Poza tym w poz. 1, 3 i 75 w piśmiennictwie brak roku, w poz. 41 i 106 brak nawiasów przy roku. Poz. 29 chyba nie jest ostatnią pozycją dotyczącą nomenklatury związków organicznych. Od tej pory chociażby w 2013 roku przygotowano rekomendacje IUPAC i nazwy preferowane związków organicznych w języku angielskim i polskim.

Przystępując do oceny całości stwierdzam, że praca stanowi wartościowy materiał naukowy o charakterze aplikacyjnym. W sposób rzetelny Doktorantka przeprowadziła liczne czasochłonne eksperymenty, wyniki których zostały starannie opracowane, choć nie zawsze przedstawione w sposób ułatwiający ich interpretację.

Stwierdzam, że pomimo znacznej liczby uwag zamieszczonych w recenzji, głównie edycyjnych, wartość bardzo pracochłonnej i potrzebnej pracy doktorskiej jest duża. Podkreślam, że jest ona oryginalnym dorobkiem naukowym i spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (tekst jednolity Dz.U.65, poz. 1789) o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki. W związku z czym mam przyjemność przedłożyć Wysokiej Radzie Wydziału Chemii, Instytutu Nauk Chemicznych, Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marty Gil do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Chemii
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach

prof. dr hab. n. med. i n. o zdrowiu
Krystyna Tyrpień-Golder