



Wrocław, 06.09.2023

Prof. Marek Drozd
Instytut Niskich Temperatur
i Badań Strukturalnych PAN
ul. Okólna 2
50-422 Wrocław

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Węglińskiej

„Analiza jakościowa i ilościowa surowców roślinnych metodami spektroskopii oscylacyjnej”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, której promotorem jest prof. dr hab. Roman Szostak powstała w Zespole Chemometrii i Spektroskopii Stosowanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego. Temat rozprawy doktorskiej wpisuje się w główny nurt badań prowadzonych w tym zespole. Tematyka analizy jakościowej oraz ilościowej w oparciu o analizę statystyczną widm oscylacyjnych stanowi temat wielu prac publikowanych przez członków tego zespołu.

Praca doktorska stanowi zbiór czterech opublikowanych artykułów, których współautorką jest Pani Magdalena Węglińska (w jednym wypadku jest pierwszym współautorem) Artykuły zostały opublikowane w latach 2018-2022 w czasopismach: Talanta (2 publikacje) oraz Antioxidants i Molecules. Czasopisma te charakteryzują się wysokimi Impact Factorami co już samo w sobie stanowi gwarancję rzetelnych i ciekawych wyników. Uzupełnieniem pracy doktorskiej są rozdziały określające cel pracy, krótki wstęp charakteryzujący wykorzystane metody spektroskopowe oraz chromatograficzne oraz opisujący szczegółowo chemometryczną analizę danych. Dodatkowo Autorka w następnym rozdziale opisuje wyniki swoich badań oraz przeprowadza dyskusję otrzymanych wyników. Rozdział ten można traktować jako przewodnik lub wprowadzenie do zamieszczonych w dysertacji publikacji. Dodatkowo w przedstawionej pracy znalazł się obszerny suplement oraz bogaty spis literatury zawierający aż 151 pozycji.

Przedstawiona do oceny praca rozpoczyna się rozdziałem definiującym jej cel. Głównym celem opisanym przez Doktorantkę jest zbadanie możliwości i ograniczeń metod spektroskopowych, głównie oscylacyjnych, połączonych z analizą chemometryczną do analizy jakościowej i ilościowej wybranych produktów roślinnych. Do badań zostały wykorzystane techniki wielowymiarowej analizy danych. Doktorantka opracowała modele pozwalające dokładnie i szybko uzyskać powtarzalne wyniki końcowe. Jako materiał badawczy w pracy wykorzystano tabletki zawierające diosminę, kłącza

pięciornika, pyłek pszczeli oraz olejek pozyskany z liści mięty pieprzowej. Niestety zabrakło szczegółowej informacji dlaczego do badań wybrano akurat te preparaty. Czy badano tylko te związki, czy też do pracy doktorskiej wybrano najciekawsze wyniki? Pomimo tej niejasności należy stwierdzić że cel pracy został określony prawidłowo. Jest on dobrze sprecyzowany, ambitny ale również możliwy do zrealizowania przez Doktorantkę.

Drugą część pracy stanowi syntetyczny opis zastosowanych w pracy metod badawczych. Opisy te są bardzo krótkie (czasami wręcz skrótowe) i nie pozwalają osobie nieorientowanej w tej tematyce na nabycie wiedzy potrzebnej do zrozumienia np. metod spektroskopowych ATR lub DRIFTS. Sądzę jednak że nie było to celem Autorki. Dogłębny opis użytych metod jest powszechnie dostępny w wielu popularnych podręcznikach. W rozdziale tym na stronie 12 użyto niezbyt fortunnego sformułowania – „współczynnik załamania próbki” zamiast powszechnie stosowanego -współczynnik załamania światła. Na stronie 13 Autorka pisze natomiast o rozcieńczaniu materiału roślinnego bromkiem potasu. Stwierdza że używano proporcji od 1:10 do 1:20, podczas gdy na stronie 28 pisze o proporcjach 3:97 oraz 1:25. Na tej samej stronie niezbyt fortunne wydaje się także sformułowanie „cechy spektralne w widmach NIR są szerokie”. Pewnego dopowiedzenia wymaga także zdanie (strona 13) dotyczące pomiaru widm Ramana. Doktorantka pisze że widma Ramana wzbudzone są przy użyciu promieniowania laserowego, ale nie wspomina dlaczego w tym przypadku potrzebne jest promieniowanie o tak dużej mocy.

Dużo bardziej interesujący i pełny wydaje się rozdział pracy dotyczący chemometrycznej analizy danych. Rozdział ten zawiera kompendium wiedzy poczynając od przygotowywania danych aż po ich analizę różnymi metodami statystycznymi. Wprowadzenie to ułatwia odbiór i analizę dalszej części pracy w której Autorka przedstawia swoje wyniki.

W pierwszej części rozdziału poświęconego omówieniu wyników oraz ich dyskusji Doktorantka opisuje w sposób szczegółowy metody pomiaru próbek z wykorzystaniem spektroskopii IR w tym pomiary NIR oraz DRIFTS oraz sposób pomiaru widm ramanowskich. Poza drobnym błędem edycyjnym (dotyczący nazwy detektora) jedyną moją wątpliwość wzbudza zastosowanie różnej rozdzielczości (przy trzech związkach rozdzielczość wynosiła 8 cm^{-1} , podczas gdy w wypadku diosminy widma Ramana zostały zarejestrowane z rozdzielczością 4 cm^{-1}). Autorka nie tłumaczy powodów takiej różnicy. Takie same wątpliwości pojawiają się w przypadku liczby użytych skanów. Dlaczego w przypadku olejku miętowego liczba interferogramów wynosi 128, podczas gdy w pozostałych pomiarach jest dwukrotnie większa?

Rozdział poświęcony omówieniu wyników rozpoczyna część pracy poświęconą danym uzyskanym w przypadku pięciornika kurze ziele. Tytułem wstępu Doktorantka opisuje niektóre z właściwości badanego materiału, koncentrując się na znanych powszechnie jego właściwościach farmakologicznych. Według Autorki w badanej roślinie wykryto do tej pory 55 różnych związków chemicznych, co samo w sobie może być wyzwaniem podczas analizy widm oscylacyjnych mierzonych dla tej rośliny. Jedyną moją wątpliwość budzi pewne niedopowiedzenie w którym Autorka wspomina, że w literaturze dostępne są publikacje opisujące wyniki badań dla kłączy pięciornika przy użyciu metod chromatograficznych oraz spektroskopowych. Jednak Doktorantka nie rozwija tego tematu. W dysertacji poświęconej badaniom spektroskopowym oczekiwałbym jednak bardziej szczegółowego opisu wcześniejszych badań z użyciem spektroskopii oscylacyjnej.

Główną część tego rozdziału stanowi szczegółowa analiza widm IR i Ramana mierzonych dla wybranego materiału oraz różnych potencjalnych jego składników. Autorka słusznie pisze że suszone kłącza pięciornika zawierają głównie polisacharydy w tym celulozę oraz pektyny i skrobię. Inne substancje obecne są w ilościach śladowych. Posługując się metodami chemometrycznymi oraz

analizując widma oscylacyjne składników chemicznych badanego materiału Autorka dokonuje poprawnego przypisania charakterystycznych pasm obecnych w mierzonych widmach. Jednym z najciekawszych wniosków zaprezentowanych przez Autorkę w tym rozdziale jest fakt, że niezależnie od zastosowanej techniki oscylacyjnej zawartość polifenoli w kłączach pięciornika można wiarygodnie z dokładnością w przedziale 3,2 – 4,0% wyznaczyć bez konieczności ekstrakcji.

Dobrego wrażenia w czasie lektury tego rozdziału nie psuje nawet drobny błąd edycyjny dotyczący użytego ciśnienia podczas przygotowywanie pastylek do pomiarów IR.

Podobny układ Autorka prezentuje w rozdziale poświęconym badaniom pyłku pszczelego. Tutaj także mamy do czynienia z obszernym wstępem dotyczącym właściwości badanego materiału, sposobem przygotowania próbek oraz bogatym fragmentem dotyczącym badań metodami spektroskopii oscylacyjnej. Dodatkowo w rozdziale tym zawarte są wyniki badań pyłku metodą NMR. Na uwagę zasługuje wysoka precyzja przeprowadzonych pomiarów. Modele zbudowane z wykorzystaniem widm IR i Ramana, według Doktorantki, umożliwią oznaczenie pH próbek pyłku z błędami RSEP w zakresie 1,5-2% co uznać należy za wynik bardzo dobry. W rozdziale tym Autorka zauważa także inną ciekawą właściwość pyłku pszczelego. W widmach ramanowskich dla próbek z wysoką zawartością polisacharydów Doktorantka obserwowała silny wzrost fluorescencji. Niestety brak jest tutaj przynajmniej hipotezy dlaczego tak się dzieje.

Należy zwrócić uwagę na szczegółową analizę widm ramanowskich prezentowaną w pracy. Przypisania pasm obserwowanych w widmach są właściwe i bardzo szczegółowe. Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na możliwość wykorzystania spektroskopii oscylacyjnej wspartej modelowaniem wielowymiarowym do jednoczesnego oznaczania ilościowego różnych grup związków obecnych w pyłkach pszczelich. Nie mniej ważny wydaje się także wniosek negatywny dotyczący wykorzystania widm oscylacyjnych pyłku pszczelego do oznaczania pierwiastków śladowych.

Niewielkie błędy edytorskie (np. na stronie 49 przeniesienie wiersza) zauważone w tym rozdziale nie wpływają na wysoką ocenę zawartych w nim wyników. Niedosyt może budzić zbyt skrótowe zaprezentowanie dotychczasowych wyników spektroskopii NMR w badaniach zarówno pyłku pszczelego jak miodu. Z obowiązku recenzenta, należy także zauważyć brak oznaczeń na osi rzędnych, na niektórych rysunkach widm zamieszczonych w tym rozdziale.

W rozdziale poświęconym badaniom olejku uzyskanego z mięty pieprzowej Autorka prezentuje obszernie fakty dotyczące zastosowań mięty pieprzowej jako leku. Liście mięty zawierać mogą ponad 300 zidentyfikowanych związków co stanowi dla Doktorantki wyzwanie przy interpretacji zmierzonych widm IR i Ramana. Autorka przedstawia w tym rozdziale swoje wyniki uzyskane za pomocą techniki ATR oraz spektroskopii Ramana. Tutaj także należy zwrócić uwagę na staranie dokonane przypisania obserwowanych na widmach pasm. Należy zwrócić także uwagę na doskonałe wyniki dopasowania uzyskane w przypadku mentolu, którego zawartość mieści się w badanych próbkach w przedziale 27-53%. Uzyskane krzywe przewidywania dla danych ramanowskich i ATR charakteryzują się w tym wypadku współczynnikami korelacji wynoszącymi 0,985 oraz 0,990 co należy uznać za wynik bardzo dobry. Podobne rezultaty uzyskano także w przypadku badań mentonu.

W mojej opinii niewielkie niedopowiedzenie występuje w przypadku omówienia wyników zawartości eukaliptolu w badanych olejkach. Autorka stwierdza tylko że podczas tworzenia modelu musiała pominąć 20 próbek ze względu na duże błędy oznaczeń jego zawartości metodą chromatografii gazowej. Nie jest jednak jasne dlaczego akurat w tym przypadku notowano tak duże błędy.

Ostatni rozdział doktoratu dotyczy oznaczenia zawartości diosminy w tabletkach dostępnych na rynku i szeroko stosowanych w leczeniu przewlekłej niewydolności żylniej. Preparaty zawierające

diosminę zapobiegają min. stanom zapalnym oraz nasilają drenaż limfatyczny. Preparat ten jest powszechnie używany i dostępny dla pacjentów. Dotychczas do oznaczania diosminy stosowano głównie metody chromatografii cieczowej. Dlatego ważne i interesujące wydaje się wykorzystanie technik spektroskopowych do badania tego związku, ponieważ znacznie skraca i upraszcza analizę.

W przypadku diosminy Doktorantka wykorzystała następujące metody spektroskopowe: spektroskopię Ramana, widma IR w zakresie średniej i bliskiej podczerwieni w tym także metodę DRIFTS. Przy czym zbadano metody te wykorzystano do badań próbki uwodnionej oraz bezwodnej. Dodatkowo badania rozszerzono o obliczenia z wykorzystaniem funkcjonału gęstości DFT przy użyciu programu Gaussian. W ten sposób uzyskano teoretyczne widma IR i Ramana dla badanego związku.

Przedstawioną analizę widm oscylacyjnych oraz przypisanie obserwowanych w widmach pasm należy uznać za poprawne i bardzo rzetelne. Opisana przez Doktorantkę procedura pomiarowa pozwala na sprawne, szybkie i wiarygodne oznaczenie ilościowe diosminy w preparatach farmaceutycznych z błędem poniżej 2,5% co należy uznać za wynik bardzo dobry.

Jednocześnie podczas lektury tego rozdziału nasunęły się pewne uwagi. Po pierwsze przy omawianiu wyników obliczeń kwantowomechanicznych pada stwierdzenie że dla punktów stacjonarnych nie uzyskano żadnych częstości urojonych. Jak rozumiem oznacza to, że Autorka uzyskała w procesie optymalizacji jedno lub kilka minimów energetycznych dla badanej cząsteczki. Według mnie wymaga to jednak doprecyzowania. Niepokojący jest także brak znaczących różnic pomiędzy widmami formy uwodnionej oraz bezwodnej. Jest to być może zrozumiałe w przypadku widm Ramana (strona 71) jednak widma IR (strona 72) powinny pokazać znaczące różnice w zakresie występowania pasm rozciągających cząsteczki wody ($4000-3000\text{ cm}^{-1}$). W mojej opinii także porównanie widm teoretycznych z eksperymentalnymi (str. 73) powinno być zaprezentowane w całym zakresie ($4000-400\text{ cm}^{-1}$).

Podsumowując stwierdzam że Doktorantka w pełni wykazała, iż w przypadku tak trudnych do pomiaru próbek jak złożony materiał roślinny konieczne i niezastąpione jest wykorzystanie w interpretacji widm oscylacyjnych zaawansowanych metod chemometrycznych. Wstępne operacje na widmach pomogły drastycznie poprawić stosunek sygnału do szumu, ograniczyć wpływ niestałości linii bazowej i zmienności parametrów pomiarowych. Zastosowanie metod statystycznych pomogło wykryć próbki odstające oraz ułatwiło wybór próbek walidacyjnych. Oznacza to że zakładany cel pracy został w pełni zrealizowany.

Stwierdzam że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim według obowiązujących przepisów prawa. Dlatego wnoszę o dopuszczenie mgr Magdaleny Węglińskiej do dalszych etapów w przewodzie doktorskim.



Prof. dr hab. Marek Drozd