

Prof. dr hab. Witold Danikiewicz
Instytut Chemii Organicznej PAN
ul. Kasprzaka 44/52
01-224 Warszawa

Warszawa, 7-06-2017

RECENZJA

pracy doktorskiej magistra Wojciecha Piotra Ostrowskiego pt. „Spektrometria mas niskocząsteczkowych związków fenolowych pochodzenia naturalnego”, wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem prof. dr. hab. Macieja Stobieckiego

Spektrometria mas jest obecnie jedną z najważniejszych metod analitycznych, stosowanych nie tylko w chemii, ale i wielu innych dziedzinach nauki. Ma też ogromne znaczenie praktyczne jako metoda badania czystości produktów codziennego użytku oraz analizy zanieczyszczeń środowiska. Szczególnie ważną rolę spektrometria mas odgrywa w chemii organicznej i bioorganicznej, gdzie służy do identyfikacji związków znanych oraz – jako metoda pomocnicza – do ustalania struktury cząsteczek związków nowych. Nowoczesne metody jonizacji, uzupełnione metodami kontrolowanej fragmentacji i dokładnego pomiaru masy jonów, pozwalają badać praktycznie dowolne związki organiczne, nawet o bardzo złożonych cząsteczkach. Praca doktorska mgr Ostrowskiego dotyczy interesującego aspektu zastosowań spektrometrii mas w analizie naturalnych związków fenolowych, powszechnie występujących w komórkach roślinnych i odgrywających ważną rolę w ich funkcjonowaniu. Jest to obecnie temat popularny, wpisujący się w szerszy nurt badań metabolomicznych, prowadzonych m. in. przez promotora rozprawy, prof. Macieja Stobieckiego. Wybór tematu pracy doktorskiej mgr. Ostrowskiego uważam więc za w pełni uzasadniony.

Rozprawa doktorska mgr. Ostrowskiego ma układ typowy dla prac z dziedziny chemii. Liczy ona 148 stron i zawiera znaczącą liczbę 237 odsyłaczy literaturowych. Rozpoczyna ją wykaz akronimów i skrótów stosowanych w pracy oraz krótkie przedstawienie celu pracy. Doktorant zdefiniował go zwięźle jako: „...pogłębienie wiedzy na temat możliwości wykorzystania spektrometrii mas do analizy jakościowej związków fenolowych pochodzenia naturalnego”, a następnie uzasadnił celowość podjęcia tych badań. Naturalne, roślinne związki fenolowe pełnią nie tylko istotną rolę biologiczną, ale też, jako składniki naszego pożywienia, mają wpływ na nasze zdrowie. Mimo badań prowadzonych już od ponad 30 lat ciągle jeszcze w tej dziedzinie jest bardzo dużo do zrobienia.

Następne 42 strony rozprawy zajmuje część literaturowa. Autor podzielił ją na dwie zasadnicze części. Po krótkim wprowadzeniu w zagadnienia metabolomiki i klasyfikacji metabolitów, mgr Ostrowski opisał podstawowe klasy związków fenolowych pochodzenia naturalnego z uwzględnieniem ich biosyntezy oraz roli biologicznej, zarówno w fizjologii roślin, jak i ich wpływu na ludzkie zdrowie. Do tej części rozprawy nie mam zastrzeżeń. Jest to dobrze opracowany przegląd, siłą rzeczy dość skrótowy, ale w pełni wystarczający jako wprowadzenie do rozprawy. Jego treść oparta jest na ponad 130 odsyłaczach literaturowych,

co świadczy o gruntownym przestudiowaniu zagadnienia przez doktoranta. Warto by pomyśleć o jego opublikowaniu np. w *Wiadomościach Chemicznych*.

Drugą część wprowadzenia literaturowego mgr Ostrowski poświęcił na przedstawienie wybranych technik spektrometrii mas. Ten fragment rozprawy podoba mi się już znacznie mniej. Nie mam zastrzeżeń co do jego poprawności merytorycznej, natomiast uważam, że Autor niewłaściwie wyważył proporcje pomiędzy omawianymi zagadnieniami. Zbędny jest moim zdaniem blisko półtorastronicowy fragment dotyczący rozdzielczości spektrometrów oraz informacja o jonizacji elektronowej. Mgr Ostrowski w swoich badaniach stosował wyłącznie jonizację elektrosprej i na niej należało się skupić. Sam opis zjawiska elektrospreju nie jest zbyt precyzyjny, a czytelnikowi na pewno pomógłby odpowiedni schemat. Całkowicie zostało pominięte niezwykle ważne zagadnienie wpływu budowy cząsteczki analitu i ew. zanieczyszczeń obecnych w roztworze na wydajność jonizacji. Ma to niezwykle istotne znaczenie w przypadku analizy złożonych mieszanin, gdzie nawet po wprowadzeniu próbki przez HPLC nadal często mamy do czynienia z układami wieloskładnikowymi, ze względu na skończoną zdolność rozdzielczą chromatografu. Takie zagadnienia, jak zjawisko supresji jonów powinny znaleźć się w tej części pracy. Uczucie niedosytu wywołuje także ostatnia część wprowadzenia literaturowego, zatytułowana „Stan wiedzy na temat wykorzystania MS do identyfikacji związków będących przedmiotem zainteresowania”. Nie mam wątpliwości, że mgr Ostrowski szczegółowo przeanalizował to zagadnienie, o czym świadczy liczba blisko 60 odsyłaczy literaturowych, ale dwie i pół strony tekstu na ten temat bez żadnych wzorów, schematów i widm to stanowczo za mało. Zmusza to czytelnika rozprawy do samodzielnego zapoznania się z cytowanymi pracami, dając jedynie szczątkowe informacje, co dana praca zawiera. Z tekstu napisanego przez Doktoranta nie wynika jednoznacznie, w jakim stopniu tematyka jego pracy, a zwłaszcza zastosowana metodyka badawcza jest oryginalna. Mam oczywiście świadomość, że opublikowanie wyników prac mgr. Ostrowskiego w trzech artykułach naukowych w dobrych czasopismach świadczy o tym, że element nowości w badaniach Autora jest wystarczający, ale niestety nie wynika to z treści rozprawy. Zyskałaby ona bardzo na dużym skróceniu opisu technik spektrometrii mas i znaczącym rozszerzeniu opisu obecnego stanu badań w dziedzinie analizy naturalnych związków fenolowych z wykorzystaniem metod spektrometrii mas.

Kolejne 5 stron rozprawy zajmuje część eksperymentalna. Jest ona tak krótka, ponieważ Autor nie musiał syntezować badanych związków. Opisał więc jedynie zwięźle przygotowanie materiału biologicznego do badań, stosowaną aparaturę oraz metodykę pomiarów. Mimo swojej zwięzłości ta część pracy pozwala na odtworzenie wykonanych przez Doktoranta badań.

Główną część rozprawy stanowi blisko 60-stronicowa prezentacja uzyskanych wyników i ich omówienie. Swoje badania mgr Ostrowski rozpoczął od zarejestrowania widm ESI w trybie jonów ujemnych 31 wzorcowych kwasów i aldehydów fenolowych. Dla wszystkich jonów pseudomolekularnych wykonał także dokładne pomiary masy oraz widma fragmentacyjne. Ponadto zbadał tworzenie się klasterów cząsteczek badanych związków z jonami metali oraz adduktów z rozpuszczalnikiem. Do tej części pracy mam kilka uwag. Przede wszystkim zabrakło mi informacji o wcześniejszych pracach prowadzonych w tym obszarze. Na przykład fakt eliminacji cząsteczki CO z anionu fenolanowego jest bardzo

dobrze znany i udowodniony na drodze znakowania izotopowego. Wiele odsyłaczy na ten i inne tematy związane z widmami MS fenoli i ich anionów można znaleźć w monografii „The chemistry of phenols” pod redakcją Z. Rappoport, J. Wiley and Sons, 2003 (rozdział 4 „Mass spectrometry and gas-phase ion chemistry of phenols”). Również eliminacja rodnika metylowego z anionów *orto*- i *para*-metoksyfenoli jest znana. Siłą napędową tej reakcji jest tworzenie stosunkowo trwałego anionorodnika *orto*- lub *para*-chinonu. Warto też wiedzieć, że w kwasach hydroksybenzoesowych atom wodoru grupy fenolowej można tak samo łatwo oderwać w formie protonu, jak atom wodoru grupy karboksylowej – wskazują na to zaawansowane obliczenia kwantowo-chemiczne – dzięki czemu wspomniana wyżej eliminacja rodnika metylowego jest możliwa. Dodatkowego komentarza wymaga także fakt tworzenia adduktów z metanolem przez aldehydy fenolowe. Chemik powinien wiedzieć, że są to po prostu hemiacetale. Dlatego też widm ESI aldehydów nie powinno się rejestrować dla roztworów alkoholowych, a jeśli jest to niezbędne, to trzeba pamiętać o tworzeniu hemiacetali.

Wyniki uzyskane podczas badania związków modelowych mgr Ostrowski wykorzystał do identyfikacji związków z tej grupy w ekstraktach z nasion dzikiej róży i liści lubinu wąskolistnego. W tej części pracy Doktorant wykazał, że rzeczywiście wykorzystanie wyników badań modelowych pozwala na identyfikację z dużym prawdopodobieństwem kwasów fenolowych w złożonych mieszaninach związków naturalnych.

Druga część wyników własnych dotyczy badań kompleksów kurkuminoidów z jonami żelaza i acetyloacetone. Doktorant starannie przeanalizował tworzenie się kompleksów o różnej stechiometrii, zawierających w niektórych przypadkach dodatkowo cząsteczki rozpuszczalnika. Niestety, opis uzyskanych wyników i ich interpretacja pozostawia sporo do życzenia. Przede wszystkim brakuje mi pełnych widm zarejestrowanych dla roztworów kurkuminy z solami żelaza(II) i żelaza(III). Na podstawie pokazanych w pracy wycinków tych widm trudno jest np. ocenić rzeczywistą proporcję abundancji jonów kompleksów o różnej stechiometrii. Także interpretacja wyników, zwłaszcza tych związanych z postulowaną zmianą stopnia utlenienia kationu żelaza może budzić wątpliwości. W przypadku pomiaru ESI w trybie dodatnim, a taki był wykorzystany przez Doktoranta, jest możliwe anodowe utlenienie Fe(II) do Fe(III), ponieważ kapilara ma potencjał dodatni i może działać jak anoda w elektrolizerze. Redukcja Fe(III) do Fe(II) jest już dużo trudniejsza do wyjaśnienia. Elektron wymagany do redukcji może pochodzić z anionu kurkuminy (lub z anionu acetyloacetone jak Doktorant sugeruje na str. 86-87), ale warto byłoby potwierdzić to np. danymi literaturowymi lub obliczeniami. Warto też pamiętać, że liczne ligandy w kompleksach metali przejściowych są określane mianem „non-innocent ligands” – niestety brak jest dobrego terminu polskiego. Oznacza to, że przyłączenie lub oderwanie elektronu od cząsteczki kompleksu nie musi oznaczać zmiany stopnia utlenienia metalu, a jedynie utworzenie aniono- lub kationorodnika z cząsteczki ligandu. Skonsultowanie tej części rozprawy ze specjalistą chemii koordynacyjnej na pewno by pomogło uściślić interpretację obserwowanych zjawisk.

Trzecia część wyników własnych dotyczy identyfikacji dehydrodimerów i cyklodimerów kwasów fenylopropanoidowych metodą HPLC/MS/MS. Ten rozdział jest praktycznie polską wersją publikacji z *Int. J. Mass Spectrom.* z roku 2016. Skoro więc recenzenci tego czasopisma uznali, że są to wyniki nowe, poprawnie przedstawione i

zinterpretowane, powinienem czuć się zwolniony z obowiązku z ich szczegółowej analizy. Jednak spojrzenie na zamieszczone zarówno w rozprawie, jak i w publikacji schematy fragmentacji zmusza mnie do stwierdzenia, że recenzenci nie za bardzo przyłożyli się do swojej pracy. Na przykład na rysunku 38 rozprawy w punkcie a) w wyniku dekarboksylacji powstaje anion styrylowy z ładunkiem na terminalnym atomie węgla, a w punkcie b) – na atomie węgla α . Oznaczałoby to pominięte na schemacie przeniesienie protonu, a zgodnie z regułami symetrii orbitali przesunięcie protonu 1,2 jest zabronione (niekorzystne energetycznie). Na tym samym rysunku, a także na kilku innych (42, 44, 47) pojawia się inny problem. Chodzi o błędne użycie strzałki o dwóch grotach, która w chemii służy do łączenia struktur rezonansowych, czyli różniących się wyłącznie rozmieszczeniem elektronów w cząsteczce. Tymczasem na rys. 38 taką strzałką są połączone struktury anionu *p*-hydroksyfenidowego i anionu fenolanowego, czyli struktury tautomeryczne, różniące się położeniem atomu wodoru w cząsteczce. Takich błędów przyszły doktor chemii nie powinien popełniać, ponieważ precyzja i jednoznaczność wzorów i schematów reakcji jest w chemii absolutnie kluczowa. Co dziwniejsze, ten sam błąd jest na schematach we wspomnianej publikacji, czyli został przeoczony przez jej recenzentów.

W czwartej i ostatniej części wyników własnych mgr Ostrowski opisuje zastosowanie techniki ruchliwości jonów sprzężonej ze spektrometrią mas do rozróżniania dehydrodimerów i cyklodimerów kwasów fenylopropanoidowych, w szczególności związków izomerycznych, których standardowa spektrometria mas nie rozróżnia (jeśli pominąć fragmentacje). Jest to moim zdaniem najciekawsza część rozprawy. Wskazuje ona drogę poprawienia skuteczności rozdziału, a w konsekwencji identyfikacji związków wchodzących w skład złożonych mieszanin. Te wyniki zasługują na szybkie opublikowanie w dobrym czasopiśmie.

Wyniki własne podsumowuje ok. jednostronicowy rozdział zatytułowany „Wnioski”. Mgr Ostrowski przedstawił tu w punktach swoje najważniejsze osiągnięcia w ramach wykonywanej pracy doktorskiej. Pracę zamyka spis literatury oraz wykaz publikacji naukowych Autora rozprawy, a także wymagane ustawą streszczenia w języku polskim i angielskim.

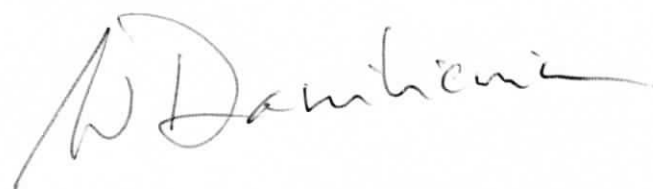
Rozprawa doktorska mgr Wojciecha Piotra Ostrowskiego jest starannie opracowana pod względem edytorskim i czyta się ją bez trudności. Autor poprawnie pisze po polsku, co w dzisiejszych czasach nie jest takie częste. Niestety popełnia też błędy, takie jak np.:

- niewłaściwe stosowanie terminu „ilość” zamiast „liczba” (np. str. 66 i 77);
- użycie terminu „intensywność” w odniesieniu do jonu zamiast do sygnału (piku) w widmie (str. 69, 81). Co ciekawe, na str. 91 Doktorant pisze o „spadku intensywności (abundancji) jonów”, a dalej używa już poprawnego terminu „abundancja”;
- żargonowe użycie terminu „jon w widmie” zamiast poprawnego „sygnał (pik) odpowiadający jonowi...” lub „sygnał (pik) jonu”.

Drobniejszych błędów, których jest zresztą bardzo mało, nie będę tu wymieniał.

Podsumowując niniejszą recenzję pragnę podkreślić, że praca doktorska Pana mgr. Wojciecha Piotra Ostrowskiego dotyczy aktualnych problemów naukowych z dziedziny spektrometrii mas i metabolomiki. Założony cel pracy Autor osiągnął. Część uzyskanych

wyników przedstawił w trzech oryginalnych pracach opublikowanych w dobrych czasopismach. Należy podkreślić, że moje dość liczne zastrzeżenia dotyczyły chemicznej i fizykochemicznej interpretacji obserwowanych zjawisk, co oczywiście nie umniejsza ich znaczenia, ale nie wpływają one na skuteczność wykorzystania wyników uzyskanych przez mgr. Ostrowskiego do celów analitycznych. Wrażenia z lektury rozprawy psują też nieco wspomniane wyżej błędy językowe, a także niewłaściwe rozłożenie proporcji w części literaturowej. Nie mam jednak żadnych wątpliwości, że **recenzowana rozprawa spełnia wymagania określone ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym. W związku z tym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr. Wojciecha Piotra Ostrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'P. Dambrowski'. The signature is fluid and cursive, with a long horizontal stroke at the end.