

Dr hab. Ewa Kłodzińska, prof. IS-PIB  
Zakład Chemii Analitycznej i Analiz Instrumentalnych  
Instytut Sportu – Państwowy Instytut Badawczy  
email: [ewa.klodzinska@insp.waw.pl](mailto:ewa.klodzinska@insp.waw.pl)  
tel: 535308429  
01-982 Warszawa  
ul. Trylogii 2/16

Warszawa, dn.06.06.2018

### **Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Julii Nowak**

#### **pt.” Opracowanie nowych metod identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych w roślinach dla potrzeb opiniowania sądowego”**

Jednym z ważnych obszarów chemii sądowej są rośliny zawierające związki psychoaktywne stanowiące często alternatywę dla nielegalnych syntetycznych związków dostępnych na „czarnym rynku”.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Julii Nowak dotyczy opracowania nowych metod identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych w roślinach dla potrzeb opiniowania sądowego. W ramach niniejszej dysertacji Autorka podjęła trudny temat zoptymalizowania i zwalidowania metodyk opartych na zastosowaniu technik LC-MS i GC-MS umożliwiających oznaczanie substancji psychoaktywnych obecnych w trzech typach roślin: psiankowatych, muszkatołowca korzennego oraz wilców. Biorąc pod uwagę fakt, iż rośliny te mogą być stosowane jako alternatywa do związków syntetycznych oraz, iż rośliny te są dostępne na polskim rynku zagadnienia poruszane przez Panią mgr Julię Nowak są bardzo istotne z punktu widzenia badań chemii sądowej. Zagadnienia te są również bardzo interesujące ze względu na wykorzystanie opracowanych procedur w próbkach naturalnych charakteryzujących się bardzo skomplikowaną matrycą oraz oceną ich realnego zagrożenia. Odpowiedni dobór i optymalizacja warunków procesu przygotowania próbek materiału roślinnego do dalszej analizy, jak również dobór odpowiednich technik analitycznych wymaga od młodego naukowca solidnej wiedzy nie tylko chemicznej ale i toksykologicznej oraz dobrej praktyki laboratoryjnej.

Wszystkie zaplanowane badania Pani mgr Julia Nowak wykonała w zespole naukowym kierowanym przez Pana Profesora Pawła Kościelniaka, który jest znanym autorytetem z zakresu chemii analitycznej, analizy przepływowej, jak również z zakresu opracowywania nowych procedur w analizie materiałów biologicznych. Promotorem pomocniczym niniejszej rozprawy jest będący Kierownikiem Pracowni Chemii Sądowej Pan Doktor Michał

Woźniakiewicz posiadający olbrzymie doświadczenie z zakresu oznaczania i identyfikacji substancji o działaniu odurzającym.

Dokonując formalnej oceny przedstawionej mi do recenzji rozprawy doktorskiej należy stwierdzić, iż licząca 153 strony dysertacja posiada układ klasyczny, na który składa się 13 rozdziałów. Praca podzielona jest na dwie części: teoretyczną i doświadczalną. Części te są poprzedzone wykazem skrótów użytych w pracy oraz streszczeniem w języku polskim i angielskim. Na końcu pracy Autorka zamieściła dodatek, w którym zawarte zostały parametry użyte do optymalizacji przeprowadzanej ekstrakcji oraz widma fragmentacyjne oraz proponowane ścieżki dla alkaloidów sporyszu uzyskane z wykorzystaniem techniki LC-MS. W zebranej bibliografii Autorka zamieściła aż 154 pozycje literaturowe, na które składają się głównie publikacje z listy filadelfijskiej z zakresu ostatnich kilku lat. Są to zatem doniesienia bardzo aktualne.

Praca zawiera krótki wstęp teoretyczny, w którym Autorka opisuje alternatywne związki psychoaktywne obecne w roślinach, określa podmiot badań, metody przygotowania próbek pochodzenia roślinnego do analizy, techniki analityczne służące do identyfikacji i oznaczania związków bioaktywnych a także metody chemometryczne wykorzystywane w analizie chemicznej.

Część teoretyczna pracy nie budzi żadnych zastrzeżeń, zagadnienia opisane są w sposób jasny, rzeczowy i zrozumiały. Doktorantka szczególną uwagę poświęciła metodom przygotowania próbek pochodzenia roślinnego opisane w literaturze, co skrupulatnie zestawiła w tabeli odnosząc się do odpowiednich danych literaturowych. Tak duża ilość cytowanych prac z tego zakresu świadczy o bardzo dobrej znajomości niniejszych zagadnień. Autorka dokonała również szczegółowego opisu wykorzystanych technik analitycznych w celu identyfikacji i oznaczania związków bioaktywnych. Szkoda jednak, że Doktorantka nie uwzględniła w tym rozdziale technik elektromigracyjnych, które są również powszechnie wykorzystywane do analizy tego typu związków.

Druga część dysertacji dotyczyła wykonanych badań w ramach pracy doktorskiej, wraz z opisem celu pracy, wykorzystanych materiałów i zaplecza aparaturowego. Jako cel pracy Autorka wskazała opracowanie metod identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych w materiale roślinnym, które mogą stanowić ważne narzędzie analityczne w opiniowaniu sądowym. Metodyka badań została starannie opisana już na początku części doświadczalnej pracy doktorskiej uwzględniając uniwersalne czynności laboratoryjne, stosowane procedury optymalizacji oraz walidację metody analitycznej. Następnie Doktorantka podzieliła pozostałą część doświadczalną pracy na badanie roślin z rodziny *Solanaceae* (pod kątem identyfikacji

atropiny i skopolaminy), badanie materiału roślinnego z muszkatołowca korzennego (pod kątem oznaczania mirystycyny) oraz badanie roślin z rodziny *Ipomoea* (pod kątem oznaczenia erginy i ergometryny).

W części pracy dotyczącej identyfikacji atropiny i skopolaminy w nasionach i liściach bielunia i Brugmansji Doktorantka opisała uprzednio zoptymalizowaną metodę ekstrakcji wspomaganą mikrofalami (MAE) oraz metody LC-MS i GC-MS. Autorka skrupulatnie podeszła do optymalizacji metody ekstrakcji z wykorzystaniem planu Doehlerta, gdyż wykonała ją osobno dla trzech rodzajów próbek: nasion i liści bielunia *Datura metel* oraz liści *Brugmansji pitteri*. Następnie dobrała optymalne warunki ekstrakcji dla obu próbek liści. Doktorantka zwalidowała metodykę osiągając satysfakcjonujące parametry (niskie granice wykrywalności dla badanych analitów oraz zadowalająca precyzję wystarczającą do przeprowadzenia analizy półilościowej).

Część rozprawy dotycząca badania materiału roślinnego z muszkatołowca korzennego pod kątem oznaczenia mirystycyny zawiera szczegółowy opis optymalizacji i walidacji trzech metod przygotowania próbek (ekstrakcja wspomaganą mikrofalami, ultradźwiękami, z wykorzystaniem myjki oraz sonotrody) oraz metody GC-MS. Bardzo ciekawym podejściem było wykorzystanie skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM) do obrazowania struktury w przypadku gałki muszkatołowej – całej oraz zmielonej oraz kwiatu muszkatołowego przed i po przeprowadzonym etapie ekstrakcji. Na tej podstawie Doktorantka wysnuła interesującą hipotezę o różnym działaniu zastosowanych technik ekstrakcji w zależności od formy i głównych składników próbki. Opracowane metody charakteryzowały się akceptowalnymi parametrami walidacyjnymi.

W ostatniej części pracy Doktorantka opisała optymalizację i walidację metody z zastosowaniem ekstrakcji z wykorzystaniem myjki ultradźwiękowej oraz LC-MS. Metoda charakteryzowała się satysfakcjonującymi parametrami (niskie granice wykrywalności i oznaczalności) oraz została z powodzeniem zastosowana do analizy próbek rzeczywistych. Doktorantka wysnuła interesujące wnioski, iż procedura może mieć znaczenie jako analiza pomocnicza w przypadkach zatrucia nasionami wilca. Dodatkowo Autorka opracowała metodę zateżnienia ekstraktów próbek śladowych z wykorzystaniem techniki mikroekstrakcji na sorbencie pakowanym pozwalającą na identyfikację alkaloidów występujących w nasionach w niewielkich stężeniach.

Opracowane przez Doktorantkę metody wymagały niewielkiego zużycia próbki, ilości organicznych rozpuszczalników oraz zapewniały szybką analizę, co jest zgodne z zasadami tak zwanej „zielonej chemii”. Ponadto, na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż Doktorantka

dokonała pełnej optymalizacji i walidacji opracowanych metodyk wraz z podejściem chemometrycznym.

Na szczególną uwagę zasługuje szeroki zakres podjętych przez Doktorantkę pracochłonnych i czasochłonnych badań doświadczalnych. Wykonanie wszystkich zadań wymagało dokładności oraz dużej wiedzy i umiejętności. Praca została napisana w sposób staranny i klarowny, cechujący się logiką i systematycznością wykonywanych badań. Rozprawa doktorska została prawidłowo podzielona i na ogół nie zawiera zwrotów anglojęzycznych i pseudofachowych oraz błędów redakcyjnych. Jedynie może razić używanie sformułowania *abundancja* zamiast *intensywność*. Doktorantka wykazała się wnikliwą analizą otrzymanych wyników, dyskusja jest wyczerpująca a wnioski sformułowane prawidłowo i trafnie.

Dorobek naukowy Pani mgr Julii Nowak obejmuje sześć publikacji z listy filadelfijskiej z sumarycznym  $IF=17.41$ . Jest to imponujący dorobek jak na tak młodą osobę. Dodatkowo Doktorantka jest współautorką czterech rozdziałów w monografiach oraz swoje wyniki badań prezentowała na licznych konferencjach naukowych o zasięgu międzynarodowym.

Nie mam zbyt wiele uwag merytorycznych. Jedyną słabą stroną niniejszej rozprawy doktorskiej jest niewykazanie najważniejszych osiągnięć Doktorantki oraz brak podkreślenia przez nią samej nowości naukowej i odniesienia jej do obecnego stanu wiedzy i techniki. Aczkolwiek wymienione uwagi krytyczne nie ujmują bardzo wysokiej oceny dysertacji Pani mgr Julii Nowak. Badania wykonane przez Doktorantkę wnoszą nowy dorobek naukowy w zakresie opracowania nowych metodyk identyfikacji i oznaczania związków psychoaktywnych i w przyszłości mogą być wykorzystane dla potrzeb opiniowania sądowego.

Stwierdzam, że recenzowana przez mnie praca doktorska Pani mgr Julii Nowak spełnia warunki i wymagania stawiane rozprawom doktorskim, określone Ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach w zakresie sztuki (art.13 ust.1) z późniejszymi zmianami. Dlatego wnioskuję do Rady Wydziału o dopuszczenie rozprawy mgr Julii Nowak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zarówno jakość pracy, jak i osiągnięcia naukowe Doktorantki są imponujące, praca jest innowacyjna i wykorzystuje nowoczesne techniki analityczne. Znaczący jest również dorobek publikacyjny Doktorantki oraz upowszechnianie przez nią wyników podczas licznych konferencji o zasięgu międzynarodowym. Praca niestety nie może być wyróżniona ze względu na niespełnienie wymogu formalnego związanego z czasem wykonania pracy doktorskiej.

Narnow, 06.06.2018

Kłodnicka Ewa