

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

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

Kraków, 20 września 2016 roku

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Krakowskiej pt.**

***Wykrywanie zafałszowań, potwierdzanie autentyczności oraz identyfikacja zagrożeń  
biologicznych z wykorzystaniem chromatografii i modelowania chemometrycznego***

### **Opis i znaczenie problemu badawczego**

Rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Krakowskiej dotyczy zastosowania nowoczesnych, zaawansowanych metod chemometrycznych do rozwiązywania bardzo istotnych problemów życia codziennego, takich jak fałszowanie produktów leczniczych, wprowadzanie na rynek zafałszowanego paliwa czy wykrywanie skażenia próbek środowiskowych środkiem biobójczym. Świadczy to o dużej ważkości podjętej tematyki. Badania prowadzono we współpracy m.in. z Instytutem Zdrowia Publicznego w Brukseli, Izbą Celną w Białej Podlaskiej oraz firmą Polcargo International, co wskazuje na aplikacyjny charakter pracy.

Fałszowanie produktów leczniczych stanowi coraz większy problem. Wysokie ceny leków oraz ograniczony dostęp do nich stanowią dużą pokusę dla grup przestępczych, które zlecają produkcję zamienników i oferują je do sprzedania w „konkurencyjnych cenach”. Z danych Światowej Organizacji Zdrowia, a także ekspertyz wykonanych przez recenzenta, wynika, że zafałszowane leki mogą zawierać niewłaściwą ilość substancji czynnej, składnik aktywny może być niezgodny z deklaracją producenta lub może go nie być w ogóle, jak również w oferowanych produktach mogą być obecne znaczne ilości zanieczyszczeń. Wiele z tych problemów wynika z faktu, że syntezы prowadzone są w nielegalnych laboratoriach bez zachowania zasad dobrej praktyki wytwarzania, zwykle z najtańszych dostępnych odczynników o niskiej jakości, przez słabo wyszkolony personel, na przestarzałym i prowizorycznym sprzęcie, w warunkach środowiskowych niewłaściwych dla laboratorium

chemicznego. W konsekwencji produkty reakcji mogą być niewłaściwe czy nieodpowiednio oczyszczone, a przez to zawierać duże ilości produktów pośrednich czy reakcji ubocznych. Z kolei niewłaściwe warunki przechowywania i transportu przekładają się na możliwość rozkładu substancji czynnych i powstania dodatkowych zanieczyszczeń. Tak wytworzone produkty oferowane są zwykle w internecie, a nabywcami są często osoby, które nie powinny ich przyjmować ze względu na wysokie ryzyko wystąpienia powikłań. Dla przykładu, osoby po przebytym zawale serca czy mające niskie ciśnienie tętnicze nie powinny zażywać sildenafilu zawartego w preparatach Viagra® badanych przez Autorkę rozprawy. To wskazuje, że eliminacja lub choćby ograniczanie fałszowania produktów leczniczych jest bardzo ważne.

Proceder „odbarwiania” oleju napędowego przeznaczonego do celów grzewczych i napędzania maszyn rolniczych, a następnie sprzedawania go jako paliwa samochodowego, w porównaniu do fałszowania leków wydaje się być mniej istotny, bowiem głównym „poszkodowanym” wydaje się być budżet Państwa (a w konsekwencji pośrednio wszyscy jego obywatele). Jednak nieumiejętne przeprowadzenie procesu „odbarwiania” oleju i używanie go jako paliwa może prowadzić nie tylko do uszkodzenia silnika czy innych elementów samochodu, ale również zwiększenia zanieczyszczenia środowiska.

Ocena stopnia skażenia środowiska, np. poprzez analizę wód rzek i jezior, jest również ważnym zadaniem. Jednym ze środków biobójczych, którego obecność w próbkach wód lądowych pobranych na zlecenie Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska starała się wykryć Doktorantka, była tributyllocyna (TBT). Substancja ta była szeroko stosowana jako składnik farb przeciwporostowych używanych w przemyśle stoczniowym do pokrywania powierzchni statków, ale po wykazaniu, że związek ten uwalnia się do środowiska powodując jego skażenie wycofano go z użycia. Nadal jednak wiele statków pokrytych jest tą substancją, dlatego zachodzi konieczność monitorowania stopnia skażenia wód, które wynika również z jej długiego okresu półtrwania.

## **Charakterystyka pracy**

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje cykl badań, w których Autorka zaproponowała nowatorskie podejścia chemometryczne do wykrywania zafałszowań produktów leczniczych w postaci tabletek Viagra® oraz oleju napędowego, jak również weryfikacji obecności tributyllocyny w wodzie, na podstawie analizy chromatogramów. Dodatkowo, Doktorantka

**Dr hab. Dariusz Zuba, prof. IES**

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

Kraków, 20 września 2016 roku

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Krakowskiej pt.**

***Wykrywanie zafałszowań, potwierdzanie autentyczności oraz identyfikacja zagrożeń  
biologicznych z wykorzystaniem chromatografii i modelowania chemometrycznego***

**Opis i znaczenie problemu badawczego**

Rozprawa doktorska Pani mgr Barbary Krakowskiej dotyczy zastosowania nowoczesnych, zaawansowanych metod chemometrycznych do rozwiązywania bardzo istotnych problemów życia codziennego, takich jak fałszowanie produktów leczniczych, wprowadzanie na rynek zafałszowanego paliwa czy wykrywanie skażenia próbek środowiskowych środkiem biobójczym. Świadczy to o dużej ważkości podjętej tematyki. Badania prowadzono we współpracy m.in. z Instytutem Zdrowia Publicznego w Brukseli, Izbą Celną w Białej Podlaskiej oraz firmą Polcargo International, co wskazuje na aplikacyjny charakter pracy.

Fałszowanie produktów leczniczych stanowi coraz większy problem. Wysokie ceny leków oraz ograniczony dostęp do nich stanowią dużą pokusę dla grup przestępczych, które zlecają produkcję zamienników i oferują je do sprzedania w „konkurencyjnych cenach”. Z danych Światowej Organizacji Zdrowia, a także ekspertyz wykonanych przez recenzenta, wynika, że zafałszowane leki mogą zawierać niewłaściwą ilość substancji czynnej, składnik aktywny może być niezgodny z deklaracją producenta lub może go nie być w ogóle, jak również w oferowanych produktach mogą być obecne znaczne ilości zanieczyszczeń. Wiele z tych problemów wynika z faktu, że syntezy prowadzone są w nielegalnych laboratoriach bez zachowania zasad dobrej praktyki wytwarzania, zwykle z najtańszych dostępnych odczynników o niskiej jakości, przez słabo wyszkolony personel, na przestarzałym i prowizorycznym sprzęcie, w warunkach środowiskowych niewłaściwych dla laboratorium

chemicznego. W konsekwencji produkty reakcji mogą być niewłaściwe czy nieodpowiednio oczyszczone, a przez to zawierać duże ilości produktów pośrednich czy reakcji ubocznych. Z kolei niewłaściwe warunki przechowywania i transportu przekładają się na możliwość rozkładu substancji czynnych i powstania dodatkowych zanieczyszczeń. Tak wytworzone produkty oferowane są zwykle w internecie, a nabywcami są często osoby, które nie powinny ich przyjmować ze względu na wysokie ryzyko wystąpienia powikłań. Dla przykładu, osoby po przebytym zawale serca czy mające niskie ciśnienie tętnicze nie powinny zażywać sildenafilu zawartego w preparatach Viagra® badanych przez Autorkę rozprawy. To wskazuje, że eliminacja lub choćby ograniczanie fałszowania produktów leczniczych jest bardzo ważne.

Proceder „odbarwiania” oleju napędowego przeznaczonego do celów grzewczych i napędzania maszyn rolniczych, a następnie sprzedawania go jako paliwa samochodowego, w porównaniu do fałszowania leków wydaje się być mniej istotny, bowiem głównym „poszkodowanym” wydaje się być budżet Państwa (a w konsekwencji pośrednio wszyscy jego obywatele). Jednak nieumiejętne przeprowadzenie procesu „odbarwiania” oleju i używanie go jako paliwa może prowadzić nie tylko do uszkodzenia silnika czy innych elementów samochodu, ale również zwiększenia zanieczyszczenia środowiska.

Ocena stopnia skażenia środowiska, np. poprzez analizę wód rzek i jezior, jest również ważnym zadaniem. Jednym ze środków biobójczych, którego obecność w próbkach wód lądowych pobranych na zlecenie Głównego Inspektoratu Ochrony Środowiska starała się wykryć Doktorantka, była tributyllocyna (TBT). Substancja ta była szeroko stosowana jako składnik farb przeciwporostowych używanych w przemyśle stoczniowym do pokrywania powierzchni statków, ale po wykazaniu, że związek ten uwalnia się do środowiska powodując jego skażenie wycofano go z użycia. Nadal jednak wiele statków pokrytych jest tą substancją, dlatego zachodzi konieczność monitorowania stopnia skażenia wód, które wynika również z jej długiego okresu półtrwania.

## **Charakterystyka pracy**

Oceniana rozprawa doktorska obejmuje cykl badań, w których Autorka zaproponowała nowatorskie podejścia chemometryczne do wykrywania zafałszowań produktów leczniczych w postaci tabletek Viagra® oraz oleju napędowego, jak również weryfikacji obecności tributyllocyny w wodzie, na podstawie analizy chromatogramów. Dodatkowo, Doktorantka

opracowała nowe podejście do konstrukcji i walidacji modeli dyskryminacyjnych bazujące na procedurze Monte Carlo. Wyniki badań zostały przedstawione m.in. w czterech pracach naukowych, opublikowanych w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, takich jak *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *Analyst*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* oraz *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, których łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) wyniósł 12,544 (3,136 na 1 pracę).

Ponadto Doktorantka opublikowała trzy inne prace w czasopismach analitycznych z listy fladelfijskiej, o łącznym IF = 10,556. Łączy dorobek publikacyjny Pani mgr Barbary Krakowskiej wynosi zatem 7 prac, o łącznym współczynniku IF = 23,1, co należy uznać za bardzo dobry wynik. Wyniki swoich badań przedstawiała również w ramach wielu konferencji i sympozjów naukowych krajowych i zagranicznych, w trakcie których wygłosiła dwie prezentacje oraz zaprezentowała piętnaście posterów.

Sama rozprawa doktorska została podzielona na 9 rozdziałów, poprzedzonych wykazem stosowanych skrótów i streszczeniem. Rozpoczyna się od wstępu i celów pracy, które zostały określone w sposób zwięzły i konkretny. Następnie przedstawione są podstawy teoretyczne, po czym Doktorantka omówiła wyniki badań własnych. Pracę kończy podsumowanie, wnioski i zestawienie literatury. Następnie przestawiony jest życiorys i dorobek naukowy Doktorantki. Jako załączniki zamieszczono kopie prac będących podstawą rozprawy doktorskiej, a także oświadczenia współautorów o zakresie ich udziału w powstaniu prac.

W części teoretycznej Doktorantka przedstawiła nowatorskie podejście do wyników analiz chromatograficznych jako specyficznych profili próbek, które określiła jako chromatograficzne odciski palca. Następnie omówiła metody chemometryczne stosowane do analizy tego typu danych, ze szczególnym uwzględnieniem wstępnego przygotowania danych chromatograficznych, oraz metody chemometryczne stosowane do badania autentyczności próbek wraz z przykładami weryfikacji autentyczności wybranych produktów w oparciu o chromatograficzne odciski palca. Bardzo wysoko oceniam część teoretyczną pracy. Według mnie, mogłaby ona być podstawą monografii na temat wykorzystania metod chemometrycznych do interpretacji danych chromatograficznych (i nie tylko). Doktorantka wykazała się ogromną wiedzą w tym zakresie, dzięki czemu w sposób klarowny przedstawiła te trudne i złożone zagadnienia, zawierając kluczowe informacje na poszczególne omawiane tematy, co ułatwiło analizę wyników badań przedstawionych w dalszej części pracy.

W rozdziale 4 Doktorantka w sposób szczegółowy przedstawiła wyniki badań własnych zawartych w czterech publikacjach naukowych będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Praca liczy 96 kart, z których 29 zajmuje wprowadzenie do tematyki badań, a 46 wyniki badań własnych. W pracy znajduje się ponad 100 odnośników literaturowych, co świadczy o szerokim rozeznaniu tematyki badawczej przez Doktorantkę.

Praca napisana jest w sposób staranny. Autorka rozprawy posługuje się poprawną polszczyzną, swobodnie operując nią w złożonej i nowej tematyce naukowej, dla której istnieje tylko ograniczone polskie słownictwo. Niezależnie od tego, w kilku fragmentach dało się wyczuć, że punktem wyjścia był publikacje w języku angielskim, co prowadziło do „angielskiej” konstrukcji zdań. Również niektóre słowa i sformułowania są raczej bliższe temu językowi, w szczególności wielokrotnie użyte słowo „komponenty” w odniesieniu do składników próbki, „F-test” czy „pozytywne wartości PC 1”.

### **Ocena metod badawczych, sposobu przeprowadzenia badań i analizy uzyskanych wyników**

W badaniach wykorzystano różne metody instrumentalne. Próbkę preparatu Viagra® badano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej stosując detektor z matrycą diodową (HPLC-DAD). Oleje napędowe analizowano metodą chromatografii gazowej z wykorzystaniem detektora płomieniowo-jonizacyjnego (GC-FID), natomiast wody lądowe metodą chromatografii gazowej sprzężoną ze spektrometrią mas (GC MS). Mając na uwadze dużą złożoność powyższych rodzajów próbek, wybór technik chromatograficznych pozwalających na rozdział składników był właściwy. Warunki prowadzenia procesu rozdziału poddano optymalizacji w celu jak najlepszego rozdzielenia składników próbek. Dobrano również warunki pracy detektorów (DAD, MS) mając na uwadze selektywność uzyskanych wyników. Pomiary instrumentalne wykonano w laboratoriach partnerskich. W każdym przypadku uzyskiwano złożone chromatogramy, charakteryzujące się często dużą liczbą pików chromatograficznych. Uzyskane profile Autorka rozprawy określiła jako „chemiczne odciski palca”, co ma wskazywać na indywidualny charakter poszczególnych próbek. Dane chromatograficzne były poddawane odpowiednim przekształceniom, a następnie analizie chemometrycznej, z uwzględnieniem walidacji uzyskanych wyników. Te etapy badań stanowiły główny obszar działalności Doktorantki, która skupiła się na realizacji następujących celów badawczych:

- ustalenie optymalnego zestawu metod chemometrycznych do ekstrakcji użytecznej informacji z uzyskanych sygnałów chromatograficznych,

- poszukiwanie z użyciem narzędzi chemometrycznych obszarów chromatogramów, które różnicują grupy badanych próbek w kontekście wykrywania zafałszowań, w szczególności preparatu Viagra<sup>®</sup>,
- opracowanie wieloparametrowych modeli diagnostycznych wspomagających wykrywanie procederu odbarwiania paliw na podstawie analiz próbek metodą GC-FID,
- opracowanie i wykazanie użyteczności systemu eksperckiego do oceny ryzyka skażenia wody tributyllocyną, bazującego na wynikach analiz metodą GC-MS, poprzez ich modelowanie z wykorzystaniem wybranych metod uczenia maszynowego.

Bardzo istotnym elementem badań ujętych w rozprawie doktorskiej było przygotowanie danych chromatograficznych do właściwych analiz chemometrycznych. Zastosowane przez Doktorantkę metody pozwoliły na eliminację lub co najmniej znaczne ograniczenie wpływu niepożądanych elementów sygnałów instrumentalnych, takich jak szum, dryft linii podstawowej czy przesunięcia pików chromatograficznych, na wyniki analiz chemometrycznych oraz ich interpretację. Ten etap badań jest często pomijany przez osoby nieznające podstaw metod chemometrycznych, a następstwem takiego działania może być uzyskanie błędnych wyników.

Skonstruowane przez Doktorantkę modele diagnostyczne, oparte o dyskryminacyjny wariant metody częściowych najmniejszych kwadratów (PLS-DA), zostały wykorzystane do rozróżnienia zafałszowanych próbek leków oraz produktów autentycznych, jak również „odbarwionych” i nieodbarwionych próbek oleju napędowego, a także wykrycia próbek wody zawierających TBT. Każdy model został poddany ocenie i opisany przez wybrane parametry walidacyjne charakteryzujące poprawność jego działania, takie jak procent poprawnej klasyfikacji (CCR), czułość, specyficzność, a także za pomocą krzywych ROC. Bardzo pomocne okazało się poznanie za pomocą zaproponowanej przez Doktorantkę procedury Monte Carlo rozkładu wartości parametrów walidacyjnych w funkcji kompleksowości modelu. Podejście to uwzględnia zmienność analizowanych zbiorów poprzez wielokrotne losowanie zbioru modelowego oraz zbiorów testowych, co wpływa korzystnie na wybór optymalnej kompleksowości konstruowanego modelu dyskryminacyjnego. Wybrane modele pozwoliły z dobrą efektywnością określić przynależność badanych próbek do określonych grup na podstawie całych chromatogramów, a także w oparciu o wybrane, istotne zmienne. Szczególnie warte uwagi jest to drugie podejście, które było możliwe dzięki temu, że Doktorantka zaproponowała nową procedurę konstrukcji i walidacji modeli diagnostycznych, która pozwala na jednoczesną estymację parametrów walidacyjnych użytych modeli o różnej liczbie

czynników dla zbiorów modelowego i testowych. Dzięki temu możliwe jest porównanie różnych metod wyboru zmiennych istotnych na etapie budowy modelu PLS-DA, a tym samym określenie tych obszarów zmiennych, np. chromatogramu, które są istotne dla dyskryminacji porównywanych próbek. Wpływa to korzystnie nie tylko na szybkość obliczeń i zapobiega przeuczeniu modeli, ale pozwala również na ustalenie składników próbki odpowiedzialnych za dyskryminację, co jest bardzo istotne w kontekście wyjaśnienia przyczyny przypisania próbek do określonej grupy i weryfikacji zasadności takiego podziału (Doktorantka bardzo dobrze to omówiła dla próbek olejów napędowych). Proponowane w pracy podejście oparte o zaawansowane modelowanie danych chromatograficznych za pomocą narzędzi chemometrycznych pozwala na uzyskanie poprawnych wyników dyskryminacyjnych bez konieczności przeprowadzenia identyfikacji składników. Niemniej jednak wydaje się, że niekiedy wyznaczenie i identyfikacja substancji kluczowych dla procesu dyskryminacji może się okazać kluczowe, np. gdy konieczne będzie przedstawianie wyników osobom o nie posiadających wiedzy na temat metod chemometrycznych, a tym samym o ograniczonym do nich zaufaniu, z jakimi mamy do czynienia zwykle na sali sądowej.

### **Uwagi szczegółowe**

Wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pani mgr Barbary Krakowskiej. Niezależnie od tego, z nałożonego na mnie obowiązku recenzenta, poniżej przedstawiłem krytyczne uwagi oraz zagadnienia, prosząc zarazem Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w trakcie publicznej obrony pracy doktorskiej.

1. Mam wątpliwości co do tytułu pracy. Po pierwsze, w mojej ocenie jest zbyt ogólnikowy i nie wskazuje jasno głównego obszaru działań naukowych Doktorantki. Po drugie, nie wiem jak Autorka rozumie różnicę między wykrywaniem zafałszowań a potwierdzaniem autentyczności. Na stronie 8 Autorka pracy podała, że autentyczność produktu określa się poprzez ocenę zgodności określonych cech danego produktu z deklaracją producenta, czego nie robiono w ramach pracy doktorskiej. Ponadto na stronie 59 wymienione są liczne metody instrumentalne stosowane w badaniach autentyczności produktów leczniczych, wśród których nie ma metody stosowanej przez Doktorantkę. Czy zatem praca rzeczywiście obejmuje badanie autentyczność produktów?

2. Omawiając problem badania próbek pochodzenia naturalnego (strona 8), Autorka pisze, że dla takich próbek, ze względu na ich złożony skład, uzyskanie optymalnego rozdziału chromatograficznego bywa bardzo trudne, a niejednokrotnie nawet niemożliwe. Należy pamiętać, że rozdział optymalny nie oznacza rozdziału idealnego, w którym każdy składnik daje oddzielny pik chromatograficzny rozdzielony do podstawy.
3. Na tej samej stronie Doktorantka zachwala detektor chemiluminescencji azotu (NCD), który w połączeniu z chromatografią gazową ma być wykorzystywany do analizy dodatków akcyzowych i ich przemian w oleju napędowym, ponieważ pozwala uzyskać selektywne sygnały instrumentalne zawierające informacje tylko o wybranej grupie związków. Dlaczego zatem w pracy nie zastosowano tego detektora lub nie porównano uzyskanych wyników z wynikami za otrzymanymi za pomocą tej metody?
4. Na stronie 18 podano, że obecność szumu jest m.in. związana z możliwością występowania w trakcie analizy reakcji pomiędzy składnikami zawartymi w próbce. Czy rzeczywiście produkty takich potencjalnych reakcji należy uznawać za składniki szumu?
5. Na rysunku 6 (str. 22) Autorka pracy pisze o eliminacji szumu i linii podstawowej. Czy zastosowane metody całkowicie eliminują szum i linię podstawową czy raczej ograniczają ich wpływ na wyniki obliczeń chemometrycznych?
6. Na stronie 26, w kontekście kodowania próbek Autorka rozprawy napisała, że przyjęta etykieta dla danej grupy jest kwestią umowną. Czy jednak ustalenie co jest „0” a co „1” (np. obecność substancji w wodzie – „1”, brak obecności – „0”, versus: nieskażona próbka wody – „1”, próbka skażona – „0”) nie wpłynie na parametry walidacji?
7. Autorka pracy na stronie 27 podała, że „w przypadku oceny zagrożeń biologicznych spowodowanych obecnością substancji szkodliwych w próbkach środowiskowych zawartość badanych analitów w skażonej próbce przekracza lub nie przekracza dopuszczalnych stężeń co w pełni uzasadnia użycie metody dyskryminacyjnej PLS-DA”, jednak nie wykonywała analizy ilościowej TBT w wodach. Czy zatem tej problematyki nie należy rozważać w kategoriach analizy jakościowej i wykrycia lub nie środka biobójczego?
8. Zaproponowane modele były oceniane za pomocą czterech różnych parametrów walidacyjnych. Czy Autorka uważa je za równocenne? Jeśli nie, to który jej zdaniem jest szczególnie istotny w naukach sądowych (czy szerzej w postępowaniu przygotowawczym lub sądowym)?
9. Jednym z głównych celów przeprowadzonych badań było opracowanie metody pozwalającej na odróżnienie paliwa odbarwianego od nieodbarwianego na podstawie chromatograficznych odcisków palca analizowanych próbek (strona 42). Czy badaniom

- poddawano również paliwo, do którego nie dodawano barwnika i markera? Wydaje się, być może złudnie, że do odróżnienia paliwa „czerwonego” od „żółtego” to nie potrzeba stosować chromatografii. Jednocześnie prawdopodobnie dużym problemem byłoby odróżnienie paliwa „żółtego”, do którego nie dodawano żadnego dodatku, od paliwa „żółtego” do którego najpierw dodano a następnie usunięto barwnik i marker.
10. Na stronie 42 Autorka podała również, że zastosowana przez nią technika nie pozwala analizować zmian zawartości znacznika i barwnika, ponieważ w temperaturze w jakiej prowadzony jest rozdział substancje te ulegają rozkładowi. Dlaczego zatem nie zastosowano innej metody, np. HPLC? Czy w warunkach metody GC-NCD, która jak uprzednio podano ma być stosowana do analizy dodatków akcyzowych i ich przemian w oleju napędowym, rozkład znacznika i barwnika nie zachodzi?
  11. Na stronie 45 podano, że za grupowanie próbek wzdłuż osi PC1 odpowiadają estry metylowe kwasów tłuszczowych (FAME) o czasach elucji 65,21 min. i 65,24 min. Na jakiej podstawie ustalono, że jest to więcej niż jedna substancja, wszak różnica w czasach elucji wynosi 0,03 min., czyli mniej niż 0,05%? Jak je zidentyfikowano?
  12. Procenty poprawnej klasyfikacji dla modeli PLS-DA o optymalnej kompleksowości, podobnie jak inne parametry walidacyjne, były na poziomie 90%, które Autorka uznała za dobre (str. 64 – 65). Czy Doktorantka uważa takie wartości za wystarczające w kontekście np. odpowiedzialności karnej osoby która zostanie oskarżona o sprzedaż potencjalnie zafałszowanych leków?
  13. Z rysunku 24 (str. 73) wynika, że współczynniki korelacji, które zostały obliczone pomiędzy sygnałami chromatograficznymi a sygnałem odniesienia wybranym z grupy próbek, wyznaczono oddzielnie dla próbek niezawierających TBT oraz zawierających TBT. Czy przy oddzielnej korekcji dla obu grup nie istnieje ryzyko, że stwierdzone różnice między nimi wynikały właśnie z tego powodu?
  14. Na stronie 81 Autorka podała, że „opracowanie danych metod statystycznych nie pozwala na to, aby personel laboratoryjny pominął procedurę kalibracji podczas rutynowej analizy próbek wody”. W jaki zatem sposób laboratorium może wykorzystać metodykę opracowaną przez Doktorantkę i na czym polega potencjalne usprawnienie funkcjonowania laboratorium, o którym mowa w celach pracy?
  15. Podając na stronach 83-84 zalety użycia detektorów takich jak np. spektrometr mas (MS), detektor z matrycą diodową (DAD) czy detektor rozpraszania światła przez odparowanie (ELS), Autorka pracy wspomina o zwiększeniu czułości, dokładności i precyzji stosowanej

metody analizy leku (co nie zawsze jest słuszne), natomiast nie wymienia zwiększenia selektywności, co jest bardzo istotne zwłaszcza w odniesieniu do detektora MS.

Powyższe uwagi nie obniżają mojej bardzo wysokiej oceny wartości merytorycznej recenzowanej pracy doktorskiej.

## **Podsumowanie**

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pani mgr Barbary Krakowskiej zawiera istotne walory poznawcze i praktyczne, co potwierdzono opublikowaniem wyników w wiodących czasopismach analitycznych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF). W części wprowadzającej Doktorantka wykazała, że posiada szeroką wiedzę teoretyczną w obszarze, w którym prowadziła badania. Współpraca z różnymi podmiotami o różnym profilu działalności świadczy o uniwersalizmie rozwiązań zaproponowanych przez Doktorantkę. Uzyskane wyniki badań winny przyczynić się do rozwoju podejść wykorzystujących modele chemometryczne w celu interpretacji danych fizyko-chemicznych w naukach ścisłych. Jest to bardzo istotne w świetle dyskusji środowisk naukowych na temat wiarygodności wyników i wniosków wyciąganych na ich podstawie w opiniach sporządzanych przez biegłych sądowych, co zostało wyrażone m.in. w krytycznym raporcie amerykańskiej Narodowej Akademii Nauk w 2009 roku, w którym wskazano na konieczność zwiększenia obiektywności stosowanych metod i walidacji uzyskanych wyników w szczególności w analizach porównawczych, które obejmują również badanie autentyczności czy wykrywanie zafałszowań.

Umiejętne przetworzenie danych chromatograficznych i stworzenie dla nich modeli chemometrycznych, wsparte nowatorskim sposobem walidacji uzyskanych wyników obliczeń, świadczy o bardzo dużej dojrzałości naukowej Doktorantki i może być stawiane za wzór do wykorzystania przez inne osoby, które będą chciały opracowywać dane instrumentalne dla celów analizy porównawczej. Zaproponowane przez Panią mgr Barbarę Krakowską strategie analiz, które zostały opisane w rozprawie doktorskiej i opublikowane w czasopismach naukowych o międzynarodowym zasięgu, mogą być także implementowane w wielu obszarach, w których problem badawczy dotyczy badania autentyczności lub wykrywania obecności względnie oceny zawartości wybranych substancji za pomocą sygnałów chromatograficznych lub innego typu danych analitycznych.

## Wnioski

Stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji praca doktorska spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w Art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2013 r. z późniejszymi zmianami. Wnioskuje zatem o dopuszczenie Pani mgr Barbary Krakowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę całokształt dorobku naukowego, oryginalność i innowacyjność przeprowadzonych badań, a także ich praktyczny aspekt, jak również zaproponowanie rozwiązań, które mogą przyczynić się do podniesienia wiarygodności wyników wykorzystywanych w naukach ścisłych, wnioskuję do Rady Instytutu Chemii Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego o rozważenie możliwości wyróżnienia niniejszej pracy doktorskiej.

