

Gdańsk, 2016-10-14

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr BARBARY KRAKOWSKIEJ zatytułowanej

**„Wykrywanie zafalszowań, potwierdzanie autentyczności oraz identyfikacja zagrożeń
biologicznych z wykorzystaniem chromatografii i modelowania chemometrycznego”**

Falsz (łac. falsum), fałszerstwo, niezgodność z prawdą są nieodłączną częścią cywilizacji człowieka. Już w VI w p.n.e. za fałszowanie monet w starożytnych Atenach zgodnie z prawami Solona, przewidziana była kara śmierci. Świadczy to dobitnie jak poważne problemy ekonomiczne przysparzało gospodarce ówczesnego państwa posługiwanie się fałszywymi środkami płatniczymi. Współcześnie, chętniej od monet fałszowane są równie cenne i pożądane produkty jak farmaceutyki czy oleje napędowe. Celem ocenianej pracy doktorskiej było m.in. ustalenie i zaproponowanie wieloparametrowych modeli klasyfikacyjnych mających zastosowanie do wykrywania zafalszowań paliw na podstawie chromatograficznych odcisków palca czy również na podstawie takiego samego typu danych analitycznych potwierdzenie autentyczności, czy inaczej zidentyfikowanie sfalszowanych, produktów leczniczych zawierających substancję czynną sildenafil, ukrywającą się pod komercyjnie znaną nazwą Viagra.

Oceniana praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr. hab. Michała Daszykowskiego, prof. UŚ, wybitnego eksperta w zakresie metod chemometrycznych i ich zastosowania do eksploracji danych analitycznych, w Instytucie Chemii, Wydziału Matematyki, Fizyki i Chemii Uniwersytetu Śląskiego i jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych zagadnień procesów analitycznych. Rezultaty badań ujęte w ocenianej pracy doktorskiej, zostały udokumentowane czterema publikacjami współautorstwa Doktorantki, w renomowanych czasopismach anglojęzycznych takich jak *Analyst*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* i *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Łączny współczynnik oddziaływania (tzw. *Impact Factor*) dla wyżej wymienionych prac wynosi 12,5. Jest to wynik znaczący i potwierdzający w niezależny sposób jakość uzyskanych wyników badań. Mgr Krakowska jest także współautorem trzech innych publikacji z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku oddziaływania 10,5 oraz licznych komunikatów plakatowych i wystąpień ustnych na krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Przedstawiona dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności kandydatki do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych.

Praca doktorska mgr Barbary Krakowskiej jest bardzo wartościowa, zawiera wiele innowacyjnych osiągnięć i cennych oryginalnych wniosków. Maszynopis pracy jest obszerny i obejmuje 98 stron a razem z CV, załączonymi publikacjami i oświadczeniami osiąga liczbę stron 166. Część teoretyczna opisana we wstępie zawiera sporo informacji ogólnych z zakresu analiz chromatograficznych tzw. „odcisku palca” a przede wszystkim chemometrycznej analizy złożonych macierzy danych pochodzących z wyników chromatograficznych oznaczeń „odcisków palca” ze szczegółowym omówieniem etapu przygotowania danych jak i metod chemometrycznych stosowanych do badań autentyczności próbek z opisem przykładów weryfikacji autentyczności wybranych produktów. Wspomniana wyżej część pracy,

sposobem i szczegółowością opisu, budzi moje uznanie dla Autorki, która wykazała się doskonałą wiedzą i znajomością przedmiotu opisywanych zagadnień.

Następnie, w części doświadczalnej określonej w pracy jako 'Badania własne' bardzo dokładnie i szczegółowo opisano takie aspekty pracy eksperymentalnej jak identyfikacja procedury fałszowania oleju napędowego, nowych metod walidacji modeli dyskryminacyjnych, identyfikacji zafałszowań leku Viagra, identyfikacji skażenia wody tributyllocyną oraz różnych metod badania autentyczności leków. Wymieniony zakres działań eksperymentalnych podjętych w pracy doktorskiej mgr Barbary Krakowskiej jest bardzo obszerny i zasługuje na docenienie. Omówienie wyników i ich dyskusja są napisane szczegółowo i rzetelnie. Udokumentowane zostały także w 6 tabelach i na 26 rycinach. Jedyne część zatytułowana 'Podsumowanie i wyniki' budzi pewien niedosyt lakonicznością i zwięzłością opisu (niewiele ponad 1 strona), moim zdaniem nieco niedostatecznym jak na tak interesującą i bogatą dysertację. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składają się 101 pozycje, z czego zdecydowana większość to publikacje, które ukazały się po 2000 roku.

Niewątpliwymi osiągnięciami Doktorantki uzyskanymi w wyniku realizacji pracy doktorskiej a opisanym szczegółowo w czterech publikacjach z listy filadelfijskiej stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego są:

- 1) oznaczenie chromatograficznych odcisków palca („fingerprints”) próbek oleju napędowego za pomocą techniki GC-FID i zastosowanie dyskryminacyjnego wariantu metody częściowych najmniejszych kwadratów, PLS-DA w celu wykrycia pozostałości barwników jako śladów zafałszowań paliwa z porównaniem trzech różnych metod wyboru zmiennych istotnych użytych w konstrukcji modelu. Na podstawie uzyskanych wyników parametrów predykcyjnych dla obu zastosowanych zbiorów modelowego i testowego oraz uwzględniając właściwości chemiczne identyfikowanych zmiennych (związki polarne) zaproponowano

metodę PLS-DA wraz z metodą wyboru zmiennych opartą na współczynniku selektywności (SR-PLS-DA) jako najbardziej optymalną metodę służącą do wykrywania zafałszowań oleju napędowego;

2) zaproponowanie nowego podejścia walidacyjnego modeli dyskryminacyjnych opartego na zastosowaniu procedury Monte Carlo. Zaproponowana metoda walidacji pozwala bezpośrednio określić optymalną kompleksowość modelu z jednoczesną estymacją wartości parametrów walidacyjnych. Zaproponowana procedura walidacyjna może znaleźć zastosowanie w analizie dyskryminacyjnej jak również klasyfikacyjnej w farmacji (zafałszowania leków) i w przemyśle spożywczym;

3) zastosowanie wcześniej omówionego nowo opracowanego podejścia walidacji wieloparametrowych modeli dyskryminacyjnych w celu poszukiwań zafałszowań produktu leczniczego Viagra w oparciu o chromatograficznie zebrane odciski palca zanieczyszczeń leku. Zaproponowany model z wykorzystaniem selekcji zmiennych metodą zmiennych znaczących dla projekcji (VIP) oraz dyskryminacyjnego wariantu metody PLS pozwolił na uzyskanie optymalnych parametrów predykcyjnych modelu dla analizowanych danych chromatograficznych zanieczyszczeń produktów leczniczych;

4) zaproponowanie modeli diagnostycznych w celu oceny zanieczyszczeń wód tributylową bez konieczności oceny ilościowej próbek a wyłącznie na podstawie sygnałów jakościowych oznaczonych przy pomocy chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrem mas (GC-MS) – chromatograficznych odcisków palca. Skonstruowany został system ekspercki charakteryzujący się dość dobrą wydajnością przewidywania otrzymanych modeli dyskryminacyjnych (procent poprawnej klasyfikacji, CCR, czułość, SE, i specyficzność, SP, wynosiły ok. 0,8).

Uzyskane w pracy doktorskiej wyniki potwierdzają kluczową rolę metod chemometrycznych w „obróbce” złożonych macierzy danych analitycznych takich jak chromatograficzne odciski

palca. Dodatkowo, wykazano unikalność chromatograficznych odcisków palca w celu porównawczego opisu składu badanych próbek. Połączenie obu wyżej wymienionych podejść analitycznych pozwolić może na uniknięcie konieczności przeprowadzania, koszt- i czasochłonnych analiz jakościowych. Zaproponowane modele matematyczne zastosowane do dyskryminacji próbek farmaceutyków (zafałszowania leków), paliwa jak również zanieczyszczeń wód powierzchniowych charakteryzowały się stosunkowo wysoką efektywnością i mają także potencjalne zastosowanie w innych obszarach badawczych.

Praca doktorska mgr Barbary Krakowskiej jest bardzo wartościowa pod względem treści merytorycznych i ma niewątpliwe walory poznawcze. Zostało to niejako potwierdzone przez fakt opublikowania wyników badań w czterech renomowanych międzynarodowych czasopismach, co poprzedzone było zewnętrznym procesem recenzenckim. Trudno jest znaleźć słabe strony recenzowanej dysertacji czy wymienić jej uchybienia. Niejako z obowiązku recenzenckiego, po lekturze dysertacji nasunęły mi się następujące pytania/komentarze.

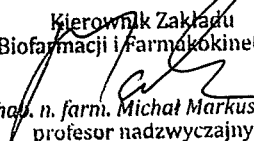
Czy zdanie w ‘Podsumowaniu i wnioskach’ na stronie 88, 7 wiersz od góry „Zastosowane techniki chromatograficzne doskonale nadają się do rejestracji sygnałów instrumentalnych stanowiących chemiczne odciski palca ze względu na proporcje pomiędzy liczbą pików a liczbą substancji (jeden pik odpowiada jednemu związkowi chemicznemu)” jest aby zawsze prawdziwe?

Jaka jest opinia Doktorantki na temat zastosowania innych metod chemometrycznych niż PLS-DA takich jak np. LASSO czy opartych na podejściu Bayesowskim do analizy złożonych danych analitycznych typu chromatograficzny odcisk palca?

Powyższe pytania, nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Barbary Krakowskiej ma wyraźne aspekty oryginalności naukowej. Jest połączeniem wiedzy i umiejętności z zakresu chemii analitycznej a

szczególnie technik chromatograficznych z opracowaniem i zastosowaniem zaawansowanych metod chemometrycznych w celu analizy i interpretacji uzyskanych danych.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego o dopuszczenie mgr Barbary Krakowskiej do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji. Jednocześnie, mając na uwadze, odzwierciedlający uzyskane wyniki, dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się w sumie aż 7 publikacji o łącznej wartości współczynnika oddziaływania $IF = 23$ (w tym trzy prace wchodzące w cykl rozprawy doktorskiej, w których mgr Krakowska jest pierwszym Autorem), składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Zakładu
Biofarmacji i Farmakokinetyki

dr hab. n. farm. Michał Markuszewski
profesor nadzwyczajny