

Wydział Inżynierii Materiałowej i Ceramiki

KATEDRA BIOCHEMII I NEUROBIOLOGII

Kraków, dn. 04.03.2019

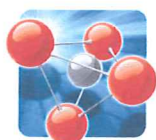
Recenzja

rozprawy doktorskiej P. mgr Karoliny Sekuły pt.:

Wykorzystanie metody LC-ESI-QTOFMS do identyfikacji nowych substancji psychoaktywnych z grupy syntetycznych kannabinoidów oraz pochodnych fenetyloaminy na podstawie sposobu ich fragmentacji.

Przedmiotem rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny Sekuły była, zakończona sukcesem, próba wykorzystania systemu LC-MS/MS do szybkiej analizy oraz jednoznacznej identyfikacji, pojawiających się na polskim rynku substancji psychoaktywnych. W badaniach skoncentrowano się na dwóch głównych grupach substancji: syntetycznych kannabinoidach oraz pochodnych fenetyloaminy. Do analizy wykorzystano technikę wysokorozdzielczej spektrometrii mas z fragmentacją cząsteczek badanych połączoną on-line z chromatografią ciecząową.

Szczególnie istotnym problemem, poruszonym w pracy, jest szybka analiza wielu bardzo zbliżonych do siebie pod względem struktury cząsteczek. Taka analiza podyktowana jest koniecznością kontroli Państwa nad ich wytwarzaniem i dystrybucją. Substancje będące przedmiotem badań, jako cząsteczki o własnościach psychoaktywnych, znajdowały się w obrocie handlowym w granicach obowiązującego prawa, ze względu na trudności legislacyjne dotyczące ich dystrybucji. By substancję uznać za mogącą znajdować się w obrocie legalnym, sankcjonowanym lokalnym prawem lub zdelegalizować jej wytwarzanie, dystrybucję i/lub posiadanie, najistotniejsze jest precyzyjne i jednoznaczne ustalenie jej wzoru strukturalnego. Osobnym zagadnieniem jest określenie jaka substancja została przyjęta przez osobę nadużywającą, co może stanowić cenną informację np. dla toksykologów. Zasygnalizowane problemy, ze względu na wysokie podobieństwo (ale nie tożsamość) struktur substancji modyfikowanych w nielegalnych laboratoriach, zaczęły stanowić obiekt zainteresowania zarówno służb prewencji jak i chemików analityków działających na zlecenie organów Państwa. Pani mgr Karolina



Sekuła zaproponowała i przetestowała jedno z dostępnych rozwiązań, bardzo dokładnie omawiając (i publikując szczegółowe wyniki) możliwości analityczne dostępnego sobie warsztatu aparaturowego.

W przedstawionej dokumentacji opisano ogółem 65 substancji poddanych analizie. Ilość ta jest reprezentatywna dla obydwu badanych grup i pozwala wysnuć wnioski, co do zaproponowanych, uogólnionych schematów fragmentacji cząsteczek, jak również podstawowych zasad ich interpretacji. To było zresztą głównym zadaniem, przed którym stanęła Autorka Opracowania.

Rozprawa stanowi zbiór dziewięciu publikacji opatrzonej obszernym wstępem, w którym nakreślono uzasadnienie podjęcia badań, sformułowano cele badawcze, scharakteryzowano tło historyczne i społeczne syntezy i obrotu substancjami będącymi przedmiotem badań, opisano metodykę analiz, aparaturę badawczą oraz wyczerpująco omówiono wyniki badań. W zakresie publikacyjnym artykuły będące podstawą rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach zajmujących się tematyką spektrometrii mas oraz analiz kryminalistycznych. Wszystkie czasopisma znajdują się na tzw. liście filadelfijskiej i charakteryzują współczynnikami impact factor w zakresie od 2,115 (Forensic Science International) do 5,756 (Forensic Toxicology). Udział Pani mgr Karoliny Sekuły w powstaniu każdej z prac należy ocenić na znaczny lub wiodący. W publikacjach: P1, P8 oraz P9 była pierwszym autorem (dodatkowo w P8 i P9 autorem korespondencyjnym), w publikacjach: P2, P3, P5, oraz P6 była drugim autorem. W pozostałych pracach Jej istotna rola również nie budzi zastrzeżeń, szczególnie biorąc pod uwagę przedłożone dokumenty potwierdzające rzeczywisty udział każdego z Autorów w powstaniu poszczególnych artykułów. Wydaje się, iż najmniejszy udział Doktorantki można oszacować dla artykułu P7, przy czym według mojej oceny, procentowy nakład pracy rozdzielonej pomiędzy Autorów można określić na około 30-35% dla każdego z badaczy, co nadal jest bardzo dobrym wynikiem. Dorobek Autorki jest dodatkowo wsparty uczestnictwem w międzynarodowych konferencjach naukowych (32 prezentacje), gdzie aktywnie prezentowała wyniki swoich badań.

Należy podkreślić, iż wyniki będące podstawą pracy doktorskiej zostały opublikowane w uznanych czasopismach o wysokiej reputacji, przechodząc każdorazowo wnikliwy proces recenzji. Stąd uznaję, że dalsza dyskusja opublikowanych wyników w ogólności nie jest celowa. Podobnie, opisany powyżej istotny udział Doktorantki w powstaniu każdej z prac jest bezdyskusyjny. Bazując na dotychczasowym wywodzie moja ocena pracy jest bardzo pozytywna. Natomiast, z obowiązku recenzenta, poniżej poruszam kilka kwestii, które nasuwają mi się jako niewystarczająco wyjaśnione lub podlegające dalszemu omówieniu.

1. Doktorantka we wstępie posługuje się terminem: jon pseudomolekularny. Z obowiązku zwracam jedynie uwagę, iż termin ten, jakkolwiek powszechnie używany, zrozumiały i popularny, zgodnie z zaleceniem IUPAC, powinien być zastępowany (co najmniej w terminologii anglojęzycznej) sformułowaniami: anionized molecule, cationized molecule, protonated ion lub deprotonated ion, zależnie od ładunku posiadanego przez omawiany jon (za: Pure Appl. Chem., Vol. 85, No. 7, pp. 1515–1609, 2013, DOI: 10.1351/PAC-REC-06-04-06)
2. W pracy istnieją częste wskazania, iż do fragmentacji używano metody ISD (fragmentacja w źródle jonów, *in-source decay*). Proszę o przedyskutowanie problemu obecności zanieczyszczeń w źródle jonów, wpływających na jakość widm fragmentacyjnych uzyskiwanych tą techniką. Proszę również o odpowiedź na pytanie jakimi przesłankami kierowała się Autorka wykorzystując podczas analiz raczej ISD zamiast konwencjonalnej fragmentacji typu CID w komorze kolizyjnej znajdującej się pomiędzy analizatorami? Dla trybu MS/MS taka właśnie konwencjonalna fragmentacja CID, w mojej opinii, ze względu na istotne wady ISD, powinna być preferowana.
3. Dla części eksperymentów konieczne było zastosowanie fragmentacji MS³ i tu, z konieczności stosowano fragmentację ISD i następnie CID w komorze kolizyjnej zlokalizowanej pomiędzy analizatorami. Czy Doktorantka podjęła jakiegokolwiek próby wykorzystania spektrometru wyposażonego w inny rodzaj analizatora, umożliwiający wykonanie MSⁿ gdzie n>2 bez konieczności stosowania ISD?
4. Na stronie 38 podano informację, iż masę związku A-834,735 wyznaczono z dokładnością do $\Delta m=0,0$ ppm. Faktycznie masa wyznaczona pokrywa się do ostatniego miejsca znaczącego (czwartego po przecinku) z masą teoretyczną wyliczoną z wzoru sumarycznego substancji badanej a zatem precyzja pomiaru jest bardzo wysoka. Tym niemniej podana informacja jest nieco myląca – w takim przypadku należy podać błąd oznaczenia masy (niepewność pomiarową/zakres błędu pomiarowego).
5. Dla ekstrakcji związku 25I-NBMD nie podano szczegółowego sposobu przygotowania próbki (kartonika nasączonego związkiem), ograniczając się jedynie do bardzo powierzchownego opisu na stronie 57 oraz nieco tylko bardziej szczegółowego w publikacji numer 8. W szczególności nie podano w jakim stosunku rozcieńczono pierwotny, metanolowy ekstrakt kartonika wodnym roztworem 0,1% kwasu mrówkowego dla potrzeb analizy LC-MS. Jest to o tyle istotne, że rozcieńczenie powinno być znaczące (co najmniej 1:25, prawdopodobnie 1:50) ze względu na możliwość zaadsorbowania

substancji badanej na prekolumnie. Zdając sobie sprawę, iż Autorka wykonała jedynie pomiar jakościowy, nadmieniam że brakująca informacja, o której wspominam, byłaby szczególnie istotna dla ewentualnego podjęcia próby pomiaru ilościowego.

6. Na stronie 58 zauważyłem nietypową pisownię slangowej nazwy związku 3,4-metylenodioksymetamfetaminy (MDMA), będącą w istocie spolszczoną kalką z języka angielskiego. Autorka posługuje się sformułowaniem „ekstazy” w miejsce anglojęzycznego ecstasy. Jakkolwiek taka pisownia funkcjonuje np. w zasobach internetu, jednak wydaje się, że warto stosować ogólnie uznany skrót nazwy (MDMA) lub pisownię anglojęzyczną (ecstasy).
7. Na stronie 59 rozprawy podjęto próbę rozwiązania sposobu fragmentacji cząsteczki 25I-NBMD. Autorka opisuje, iż rozpad cząsteczki podczas fragmentacji jest nietypowy. W publikacji 8 zawarto podobne, nieco rozwinięte sformułowanie. Posługując się zaproponowanym schematem fragmentacji należałoby przyjąć, iż cząsteczka rozpada się na dwie, chemicznie niezwiązane pochodne. Podczas tego procesu następuje oderwanie grupy $\text{CH}_2=\text{NH}$ i ponowne połączenie dwóch niezależnych fragmentów w postać jonu jednododatniego o $m/z=286,12$. Jeśli cząsteczka nie cyklizuje lub nie oligomeryzuje (na co nie wskazują widma masowe) taka interpretacja w domyśle nakazuje przyjęcie możliwości chwilowego rozpadu zjonizowanej cząsteczki wewnątrz spektrometru masowego z odtworzeniem wiązania kowalencyjnego po rozpadzie jednej z pochodnych. Tego rodzaju zjawisko, bez żadnej stabilnej formy pośredniej, wydaje mi się, z termodynamicznego punktu widzenia, bardzo mało prawdopodobne. Czy w związku z moją wątpliwością istnieje inne wytłumaczenie obserwowanego zjawiska? Czy istnieje np. możliwość koelucji substancji zanieczyszczającej badany związek, która daje jon o m/z 286,12 lub rozpada się podczas ISD do jonu będącego przedmiotem kontrowersji? Czy Doktorantka próbowała użyć spektrometru o innej konstrukcji do potwierdzenia obserwacji? Na marginesie, moja wątpliwość co do obserwowanego rozpadu zdaje się znajdować potwierdzenie w dalszych akapitach rozdziału „Badania pochodnych fenetyloaminy” (strony: 60-61) gdzie Autorka wskazuje na jony fragmentacyjne zbliżonych do 25I-NBMD cząsteczek (np. 25iP-NBOMe) gdzie główne ścieżki fragmentacji prowadzą do rozpadu wiązań sąsiadujących z atomem azotu linkera bez tworzenia egzotycznych jonów potomnych.

Pomimo kilku wskazanych powyżej, raczej drobnych uwag i komentarzy, przedłożona praca jest cennym opracowaniem dla aplikacji w laboratoriach chemii sądowej, w związku z wielokrotnie podnoszonym w pracy problemem dotyczącym

szybkiej i jednoznacznej identyfikacji nowopowstających związków o działaniu psychoaktywnym. Informacja o strukturze danego związku jest niebywale przydatna, zarówno z punktu widzenia lekarzy-toksykologów, jak i organów ścigania. Oceniana praca doktorska bezspornie spełnia wymagania zwyczajowe oraz również formalne Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz 595 ze zmianami Dz.U. z 2005 r. nr 164, poz 1365). W szczególności, jak stanowi artykuł 13 przytoczonej ustawy, dysertacja stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną Kandydatki w danej dyscyplinie badawczej a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W zakresie sposobu przygotowania rozprawy potwierdzam (ponownie zgodnie z art. 13 ustawy), iż Doktorantka bezsprzecznie dowiodła swojego indywidualnego wkładu w przygotowanie pracy.

W związku z powyższym, z przyjemnością wnoszę do Wysokiej Rady Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Sekuły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, w związku z wysoką istotnością badań, w których widzę duży potencjał aplikacyjny i wdrożeniowy (tj. znaczne poprawienie skuteczności i szybkości identyfikacji nowych związków o działaniu psychoaktywnym) składam wniosek o wyróżnienie przedstawionej mi do oceny pracy doktorskiej.

Kraków, dn. 04.03.2019

