



prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki Medycznej
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381

Recenzja pracy doktorskiej mgr Mileny Majchrzak

„Chromatograficzne i spektroskopowe oznaczanie nowych substancji psychoaktywnych (tzw. dopalaczy) w materiale rzeczowym i biologicznym”

Dopalacze, czyli produkty zawierające niekontrolowane substancje psychoaktywne, stały się istotnym problemem w Polsce w ciągu ostatnich lat. Mimo szeroko zakrojonych akcji informacyjnych znane są przypadki śmierci spowodowanej zażyciem nieznaną substancji, często w niewielkich ilościach.

Analiza chemiczna dopalaczy jest szczególnie trudna, ponieważ w obrocie rynkowym znajdują się tuziny substancji psychoaktywnych, a z każdym miesiącem pojawiają się nowe, dotychczas nieobecne. Analitik sądowy musi liczyć się z koniecznością określenia struktury chemicznej związku, dla którego nie ma żadnych referencyjnych danych widmowych i chromatograficznych. Dodatkowo, oprócz właściwej substancji, w próbkach mogą się znajdować metabolity, a matryca materiału pobieranego pośmiertnie jest złożona i wymaga prawidłowych technik ekstrakcji.

W ten trend badawczy wpisuje się dysertacja doktorska mgr MILENY MAJCHRZAK, wykonana w Zakładzie Chemii Ogólnej i Chromatografii Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego pod kierunkiem dr hab. MIECZYŚŁAWA SAJEWICZA oraz dr n. med. RAFAŁA CELIŃSKIEGO jako promotora pomocniczego.

Rozprawa liczy 119 stron i jest napisana w typowym dla dysertacji doktorskich układzie: wstęp, część literaturowa, cel pracy, glosariusz, opis badań własnych, podsumowanie i bibliografia. Dodatkowo na końcu dysertacji znajduje się zestawienie dorobku naukowego.

W części literaturowej Autorka dość zwięźle, ale bardzo aktualnie i w wyselekcjonowany sposób wprowadza czytelnika w problemy dotyczące dopalaczy. Na początku poza charakterystyką głównych wyzwań walki z dopalaczami znajdziemy komentarz do obecnej sytuacji prawnej. Dalej Doktorantka omawia pochodne katynonu, rozpoczynając od naturalnych związków obecnych w świecie roślin, przechodząc przez farmakologię tych związków, a kończąc na najnowszych pochodnych zidentyfikowanych na czarnym rynku.

Kolejny rozdział zawiera opis technik instrumentalnych używanych do identyfikacji substancji psychoaktywnych. W zwięzły sposób, ale skupiając się na właściwych szczegółach, Doktorantka omawia zalety oraz ograniczenia takich metod jak chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS) i chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS).

Cel pracy sformułowany został w czterech głównych punktach. Doktorantka postanowiła rozpocząć badania od opracowania efektywnych procedur izolacji z matryc proszkowych, a następnie powzięła zamiar zidentyfikowania i opisanie analitycznego nowych substancji, dla których brakowało danych

referencyjnych. Kolejną częścią badań była identyfikacja i opracowanie metody ilościowego oznaczania substancji w sądowym materiale pośmiertnym. Z wyników powstała również biblioteka danych analitycznych mogąca stanowić referencyjne dane dla innych laboratoriów sądowych.

Optymalizacja ekstrakcji prowadzona była na dwóch próbkach stanowiących dowody rzeczowe zabezpieczone przez organy ścigania. W jednym z nich Doktorantka zidentyfikowała α -pirolidynyloheksafenon (1-fenilo-2-(1-pirolidynylo)-1-heksanon, α -PHP) a w drugim 1-(4-fluorofenilo)-2-(pirolidyn-1-ylo)oktan-1-on (4F-PV9). Spośród sześciu czystych rozpuszczalników i jednej mieszaniny dwuskładnikowej, ta ostatnia okazała się optymalna do przeprowadzenia analizy.

Identyfikacja została przeprowadzona przez Autorkę metodami GC-MS, HPLC-MS, termogravimetrią oraz różnicową kalorymetrią skaningową. Użyty zestaw narzędzi pozwala na wyczerpujące określenie tożsamości nieznannej substancji psychoaktywnej, a Doktorantka wykazuje umiejętność stosowania ich wszystkich oraz krytycznej oceny otrzymanych wyników.

Następnie zestaw 14 nowych związków o znanej strukturze został przez Autorkę przebadany technikami ESI-MS oraz EI-MS celem zarejestrowania sygnałów i dodania ich do referencyjnej biblioteki widm. Wszystkie widma zostały właściwie zinterpretowane i oceniono możliwe ścieżki fragmentacji. Doktorantka w tej części udowadnia dużą dojrzałość w samodzielnej interpretacji danych MS/MS. Zbadane związki zostały zestawione wraz z danymi literaturowymi dla zbliżonych substancji w celu dla analityków sądowych tabelę zawierającą referencyjne dane analityczne.

Ostatnia część pracy przedstawia badania materiału pośmiertnego: krwi, płynu z gałki ocznej, wycinków nerki, wątroby i mózgu. Doktorantka zastosowała standardowe procedury ekstrakcyjne materiału biologicznego, zidentyfikowała trzema technikami obecny w tych próbkach związek, potwierdziła jego obecność techniką immunoenzymatyczną, a następnie oznaczyła ilościowo metodą dodatku z zastosowaniem wzorca wewnętrznego. Metoda została w podstawowy sposób zwalidowana pod kątem typowych parametrów.

Bibliografia dysertacji liczy 46 pozycji. Nie jest to zbyt dużo, jednak są one bardzo starannie dobrane.

Moje drobne uwagi, wymienione poniżej z obowiązku recenzenta, dotyczą szczegółów nie mających wpływu na wysoką ocenę pracy.

1. Użycie samotnego słowa „biblioteki” bez dodatkowego wyjaśnienia na początku pracy i dalej w wielu miejscach może być niewystarczające, nie każdy bowiem domyśli się, że chodzi tu o bibliotekę widm.
2. Sformułowanie „nielegalny prawnie” jest pleonazmem.
3. Autorka podaje na stronie 15, iż prowadzono badania *in vitro* dotyczące przepuszczalności bariery krew-mózg dla syntetycznych katynonów. Jakimi technikami można prowadzić takie badania bez użycia zwierzęcych modeli doświadczalnych?
4. Na stronie 22 Doktorantka pisze, iż w związku z nieznanym mechanizmem działania oraz toksycznością każdej z nowych substancji psychoaktywnych, ich połączenie może wiązać się z wzajemnym synergistycznym działaniem. O jakim mechanizmie działania jest tu mowa, skoro wcześniej jest on wyjaśniony dla tej grupy związków?
5. W jaki sposób (strona 28) możliwa jest wstępna identyfikacja związków bez substancji referencyjnych w detekcji QTOF-MS?

6. Czy analiza DSC była faktycznie prowadzona od ujemnej temperatury (strona 34), czy jest to błąd?
7. Czy biblioteka CaymanChem zawierała dokładnie te związki i umożliwiała pełną identyfikację, czy jedynie związki podobne?
8. Skąd została przygarnięta gotowa metoda ekstrakcji z materiału biologicznego (strona 102)?
9. Co oznacza określenie, że *próbki ludzkie nie są negatywne dla docelowego związku* (strona 104)?

Wyniki przedłożonej do recenzji pracy doktorskiej zostały już opublikowane w dobrze punktowanych czasopismach, a całkowity dorobek naukowy Doktorantki, wymieniony na końcu dysertacji, mimo iż nie stanowi w przewodzie doktorskim przedmiotu formalnej oceny, zasługuje na pochwałę.

Podsumowując, praca doktorska Mileny Majchrzak spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim, zawiera istotne elementy nowości naukowej i wnioskuję o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo ze względu na aktualność tematyki badawczej, pionierskość przeprowadzonych badań, wszechstronność użytych narzędzi, a przede wszystkim aplikacyjność wyników, wnioskuję o głosowanie nad wyróżnieniem przedłożonej mi do recenzji pracy.

Katedra i Zakład Chemii Leków
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Łukasz Komsta

Lublin, 13 lipca 2018.