



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

Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Marczeńskiej

„Kontrola jakości środków ochrony roślin z wykorzystaniem technik chromatograficznych i elementów modelowania chemometrycznego”

ROLNICTWO towarzyszy ludzkości od ponad 10 tysięcy lat, a początki uprawy roślin miały miejsce w okresie rewolucji neolitycznej na Bliskim Wschodzie. Choć od zawsze poszukiwano środków wspomagających uprawę, przez większość czasu ograniczano się wyłącznie do metod naturalnych. Eksplozja chemicznej ochrony, jaka miała miejsce dopiero w XIX i XX wieku, postawiła przed cywilizacją problemy i dylematy związane z toksycznością takich zabiegów i zanieczyszczeniem środowiska.

Problemy te są aktualne, a odnalezienie właściwej równowagi między ekologią a zapotrzebowaniem na żywność jest tematem niekończących się dyskusji. We współczesnym ekosystemie nie ma możliwości opłacalnej produkcji rolnej bez użycia pestycydów. Konieczne jest jednak ich umiejętne i rozważne dawkowanie oraz kontrola tożsamości, autentyczności i jakości. Podobnie jak w przypadku leków, poważnym problemem jest nielegalne wprowadzanie do obrotu preparatów podrobionych lub zafałszowanych, których skład chemiczny bywa praktycznie dowolny. Może to skończyć się brakiem założonego działania i utratą plonów, a w skrajnych przypadkach skażeniem produkowanego materiału roślinnego i środowiska.

W ten trend badawczy wpisuje się dysertacja doktorska mgr PATRYCJI MARCZEŃSKIEJ, wykonana w Laboratorium Badania Jakości Środków Ochrony Roślin Instytutu Ochrony Roślin - PIB Oddział Sośnicowice, z przewodem doktorskim realizowanym w Instytucie Chemii Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach pod kierunkiem dr hab. MIECZYŚLAWA SAJEWICZA.

Badania pracy stanowią część projektu „Zwiększenie konkurencyjności polskich towarów roślinnych na rynkach międzynarodowych poprzez podniesienie ich jakości i bezpieczeństwa fitosanitarnego” przygotowanego przez konsorcjum złożone z Głównego Inspektoratu Ochrony Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytetu Warszawskiego, Instytutu Lotnictwa, Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB oraz Instytutu Ochrony Roślin PIB.

Rozprawa liczy 130 stron (bez odbitek publikacji dołączonych na końcu) i jest napisana w języku polskim, w typowym dla dysertacji doktorskich układzie: streszczenie, cel pracy, wprowadzenie z częścią teoretyczną, część doświadczalna z wynikami, wnioski, spis rysunków i tabel oraz piśmiennictwo. Jako załączniki dodano listę publikacji, spis doniesień zjazdowych oraz CV autorki.

Część teoretyczna wprowadza czytelnika w tematykę pracy: omawia rys historyczny ochrony roślin, współczesne klasyfikacje i definicje środków ochrony, statystyki sprzedaży i problemy nieprawidłowości (zafałszowań oraz uchybień w jakości). Autorka używa starannej narracji dysertacyjnej, podkreślającej określone, starannie wyselekcjonowane fakty z dotychczasowej wiedzy. Potwierdza to

staranne zapoznanie się z literaturą, liczącą ponad 150 pozycji. Wyglądają na precyzyjnie wybrane z jeszcze większej liczby przeanalizowanych źródeł.

W języku polskim panuje niestety duża dowolność w tłumaczeniu terminów dotyczących chemometrii i analizy danych. O ile np. PCA nazywana jest równie często zarówno *analizą głównych składowych*, jak i *analizą czynników głównych*, o tyle pierwszy raz spotykam się z tłumaczeniem terminu *cluster analysis* jako *analiza wiązkowa*, czy też z terminem *resztkowe odchylenie standardowe* — czy to jest *residual standard error*? Zdecydowanie lepiej podawać angielskie, jednoznaczne nazwy metod lub terminów, dzięki czemu nie byłoby dla mnie tajemnicą czym jest *odległość potęgowa*, jak również czy *połączenie* oraz *wiązanie* jest tym samym, co angielskie *linkage*.

Autorka badała koncentraty zawiesinowe, zawierające jako substancję czynną azoksytrobiny. Substancja posiada w swojej strukturze podwójne wiązanie i wyłącznie izomer E jest substancją czynną. Izomer Z oraz toluen są głównymi zanieczyszczeniami preparatów.

Badaniu poddano zarówno próbki bezpośrednio od producenta, jak też z rynku, dostarczone przez zleceniodawców celem kontroli ich jakości. Środki badane w projekcie zawierały dodatkowe substancje zarejestrowane w Polsce (chlorotalonil, cyprokonazol, tebukonazol, difenokonazol, propikonazol, epoksykonazol, izopirazam), które mogą legalnie występować w preparatach azoksytrobiny.

Metodyka analityczna została opracowana zgodnie z wymogami zawartymi w dokumencie SANCO/3030/99 (*Technical Active Substance and Plant protection products: Guidance for generating and reporting methods of analysis...*) oraz dokumentach CIPAC (*Guidelines on method validation... i Guideline for analytical methods for the determination of relevant impurities...*).

Opracowując metodę ilościową, Autorka uzyskała bardzo dobre rozdzielanie pików izomerów azoksytrobiny, a obie substancje wykazywały liniową odpowiedź w badanych zakresach stężeń, nieistotność wyrazu wolnego w równaniu kalibracji oraz dobry współczynnik korelacji. Precyzja metody była w pełni zadowalająca, biorąc pod uwagę możliwości techniki HPLC. Badane preparaty poddawano dodatkowo standardowym oznaczeniom pH, trwałości zawiesiny, pozostałości na sicie mokrym, gęstości oraz barwy.

Uzyskane wyniki poddano analizie PCA oraz HCA. W przestrzeni głównych składowych nie uzyskano wprawdzie wyraźnej przerwy pomiędzy próbkami autentycznymi i sfalszowanymi, jednakże klasy obiektów dobrze separowały się wzdłuż kierunku pierwszej głównej składowej. Doktorantka zidentyfikowała dwie zmienne najbardziej odpowiedzialne za różnice: zawartość substancji czynnej oraz gęstość.

Wydaje się, że interpretację można śmiało rozszerzyć na wszystkie zmienne za wyjątkiem pozostałości na sicie mokrym, która wchodzi wyłącznie do drugiej składowej. Ocena różnic pomiędzy klasami testem Wilcoxon (ze względu na nieznaną rozkład zmiennej) pozwala tu stwierdzić, że istotność różnicy pomiędzy zawartością substancji czynnej nie jest wcale tak wyraźna ($p \approx 0,14$), a sfalszowane preparaty zawierają tylko nieco mniej substancji. Znacznie większa różnica jest w przypadku gęstości (wartość mniejsza dla sfalszowanych, $p \approx 10^{-8}$), trwałości zawiesiny (wartość mniejsza dla sfalszowanych, $p \approx 0,004$) i wody (wartość większa w zafalszowanych, $p \approx 10^{-5}$).

Współczynnik pH w przypadku preparatów oryginalnych praktycznie nigdy nie schodził poniżej wartości 5,75, podczas gdy dla sfalszowanych rozkład wartości ogonował w dół, mimo że różnica nie jest istotna ($p \approx 0,22$). Wszystkie preparaty autentyczne mają wartość koloru wynoszącą 2,5; zaś sfalszowane 5,0; a nawet w przypadku jednego 7,5.

Autorka zastosowała dodatkowo metodę PLS-DA do konstrukcji modeli dyskryminacyjnych w oparciu o 7 powyższych zmiennych. Niezależnie od przyjętych kompleksowości, modele wykazywały bardzo dobre rozróżnianie próbek użytych do uczenia, zaś w przypadku zestawu testowego radziły sobie dobrze z połową próbek.

Wyniki PLS-DA wstępnie potwierdzają możliwość stworzenia dobrze działających dyskryminacyjnych modeli, a właściwa zdolność dyskryminacyjna powinna być bezproblemowo osiągnięta w przypadku dysponowania odpowiednio dużym zestawem próbek do przygotowania modelu. Dodatkowo, biorąc pod uwagę zależności między zmiennymi, należy spodziewać się optymalnego działania przy niskich kompleksowościach takich modeli (rzędu 1 lub 2, góra 3). Model PLS skonstruowany na pełnych danych nieskalowanych jest w stanie w pełni odseparować klasy linią prostą przy dwóch pierwszych składowych, a dla danych skalowanych robi to (choć z trudem) już dla jednej. Kolejne składowe nie zawierają informacji dyskryminującej klasy. W przypadku, gdy właściwości predykcyjne modeli nie zmieniają się wraz z kompleksowością (jak w Tabeli 15) dobrze jest dokonać (mimo różnych poglądów w środowiskach chemometrycznych) porównania wartości błędów walidacji krzyżowej i predykcji, analogicznie do modelu ilościowego.

Kolejnym etapem badań była chemometryczna analiza chromatogramów badanych próbek, zarówno HPLC-DAD, jak i HS-GC/MS. Doktorantka wykonała konieczną do takiej analizy wstępną obróbkę danych, obejmującą korekcję linii bazowej oraz nakładanie sygnałów oraz transformację logarymiczną — czy istnieje jakiś konkretny powód, że była ona konieczna? Podczas nakładania sygnałów, jako pierwszy etap Autorka wykonała „zniesienie różnic zaobserwowanych dla powtórzeń zarejestrowanych dla tej samej próbki” - dlaczego? Który chromatogram był referencyjny do nakładania i jak został wybrany?

Chromatogramy przeanalizowano techniką SIMCA, określając odstępstwo badanych próbek od danych treningowych, które stanowiło 15 pierwszych, oryginalnych próbek. Doktorantka przedyskutowała, które próbki odstawały znacząco od modelu pod względem odległości ortogonalnej oraz odległości Mahalanobisa.

Pełną interpretację sprawności modelu SIMCA utrudnia nieco brak jasnej deklaracji, które z próbek o numerach powyżej 100 były sfalszowane. Informacji tej nie ma zarówno w pracy, jak i w publikacji stanowiącej załącznik. Analizując wynik HCA na danych można wnioskować, że autentyczne na dendrogramie są (oprócz 1 — 15) próbki 101, 103 — 109, 112 — 115 oraz 132 i 133. Daje to 19 próbek sfalszowanych i 29 (15 + 14) próbek autentycznych. Wykres 13 zawiera tymczasem tylko 18 próbek nieoryginalnych, zaś 30 lub 31 autentycznych - dlaczego?

W takiej sytuacji SIMCA na chromatogramach HPLC-DAD dobrze klasyfikuje próbki 101, 103 — 109 i 112 — 114 jako oryginalne, zaś próbki 115, 132 i 133 są sklasyfikowane niewłaściwie jako odstające. Czy można w jakikolwiek sposób zinterpretować, jakie posiadają cechy, które to spowodowały? W przypadku modelu SIMCA z danych GC tylko 3 próbki są słusznie sklasyfikowane jako oryginalne, pozostałe odbiegają od modelu i tutaj też przydałaby się interpretacja. Ponadto na wykresach SIMCA pojawia się nieistniejąca wcześniej próbka 100, zaś brakuje próbki o numerze 133, co sugerowałoby przesunięcie w numeracji, powodujące jeszcze większą rozbieżność w klasyfikacji.

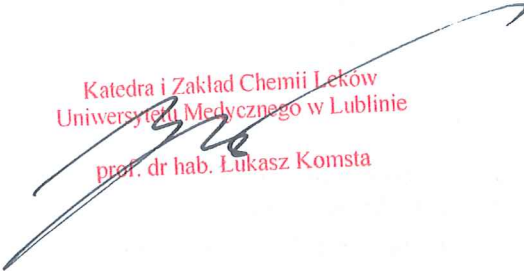
Ostatnią częścią pracy było opracowanie ilościowej metody oznaczania azoksytrobiny w obecności innych substancji występujących z nią w preparatach na polskim rynku (chlorotalonil, cyprokonazol, difenokonazol, epoksykonazol, izopirazam, propikonazol oraz tebukonazol). Optymalny chromatogram substancji wzorcowych robi wrażenie i zapewnia pełne rozdzielenie tych substancji podczas analizy, a metoda została w pełni zwalidowana pod względem wszystkich aktualnych wymogów.

W przypadku publikacji warto dodatkowo pochwalić się pełną ścieżką eksperymentalną optymalizacji warunków chromatograficznych, gdyż raport z takiej optymalizacji ma również cenną wartość naukową.

Rozprawa stanowi całościowy i dobrze skonstruowany projekt badawczy. Wyniki zostały w części opublikowane w Journal of Environmental Science and Health, Part B i stanowią materiał do kilku dalszych publikacji na wysokim poziomie w punktowanych czasopismach. Dostrzegam w nich spory potencjał i przewiduję istotne zainteresowanie tymi wynikami przez inne grupy badawcze.

Podsumowując, praca doktorska Patrycji Marczewskiej 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 spełnienie aktualnych wewnętrznych wymogów UŚ, interdyscyplinarność tematyki badawczej, realizację pracy w ramach dużego projektu naukowego, a przede wszystkim aplikacyjność przeprowadzonych badań wnioskuję o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji pracy.



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

Lublin, 12 grudnia 2021.