WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, opole
tel. 077 452 71 00 fax 077 452 71 Ol
chemia@uni.opole.pl
www.chemia.uni.opole.pl

UNIWERSYTET

O P O L S K I

opole, 2024-01-05

Prof. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek e-mail: Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Izabelli Kośki

zatytułowanej

„Nowoczesne sposoby przygotowania próbek biologicznych i środowiskowych w oznaczaniu leków”

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Izabelli Kośki została wykonana w Katedrze Chemii Srodowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem dr hab. Pawła Kubalczyka, prof. UL jako promotora. Przedmiotem ocenianej rozprawy doktorskiej są zagadnienia związane z opracowaniem nowych procedur analitycznych użytecznych w oznaczaniu wybranych farmaceutyków w żywności i płynach fizjologicznych.

Substancje lecznicze to jedna z najważniejszych grup związków, stosowanych w produkcji zwierzęcej, a tym samym zanieczyszczających żywność i środowisko naturalne, a co nie mniej istotne o dużej aktywności biologicznej. Szczególnie często w produkcji zwierzęcej stosowane są syntetyczne antybiotyki, takie jak fluorochinolony, ze względu na ich szerokie spektrum działania zarówno przeciwko bakteriom Gram-dodatnim, jak i Gramujemnym. Inną grupą powszechnie stosowanych leków weterynaryjnych są leki uspokajające, przede wszystkim azaperon, podawane zwierzętom podczas ich transportu do rzeźni, w celu zminimalizowania ryzyka ich śmierci i utrzymania wysokiej jakości mięsa. Ze względu na ich coraz to większe zastosowanie są one zatem obecne zarówno w żywności, jak i w środowisku,

do którego dostają się wraz ze ściekami. Wynika to z faktu, iż związki te w niewielkim stopniu są metabolizowane, a efektywność ich usuwania w oczyszczalniach ścieków jest nieznaczna. Ponadto ich metabolity również mogą wykazywać znaczącą aktywność biologiczną. Negatywny wpływ tego typu substancji na organizmy żywe jest zatem bezsporny, dlatego też niezbędne są badania dotyczące opracowania skutecznych metod ich oznaczania i stałego monitorowania w żywności i środowisku.

Aby w efektywny sposób monitorować obecność farmaceutyków, należy uwzględnić fakt, iż próbki rzeczywiste, w których związki te są obecne, odznaczają się złożonym składem matrycy, w której często poziom innych substancji przewyższa stężenie analitów. Dlatego też niezbędne jest opracowanie czułych i wiarygodnych procedur analitycznych umożliwiających oznaczanie zawartości tych związków w pożywieniu i płynach fizjologicznych.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Izabelli Kośki, wykonana pod kierunkiem dr. hab. Pawła Kubalczyka, prof. UL, mieści się w tym zakresie i dotyczy opracowania prostych, szybkich, czułych i tanich metod oznaczania cyprofloksacyny (Cpx) i ofloksacyny (Ofx), najpowszechniej stosowanych antybiotyków fluorochinolonowych, w moczu człowieka i tkankach zwierząt oraz często używanego środka uspokajającego, azaperonu oraz jego metabolitu azaperolu w tkankach zwierząt.

Oceniana rozprawa nie została napisana w klasycznym układzie pracy doktorskiej i zgodnie z przepisami opublikowanymi w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455, art. 13, ust. 2 stanowi spójny tematycznie zbiór 4 prac, opublikowanych w międzynarodowych czasopismach o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) poprzedzony wstępem literaturowym. Pracę rozpoczyna wykaz skrótów i symboli oraz wykaz publikacji wchodzących w zakres rozprawy. Po czym następuje wstęp literaturowy, w którym Autorka omawia fluorochinolony i azaperon (AZN) oraz jego metabolit azaperol (AZL), ich właściwości, a także aktywność biologiczną. Następnie przedstawia wybrane metody oznaczania tych substancji. Tę część kończy krótkie uzasadnienie wyboru tematyki badań.

Wszystkie prace, stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej, to prace wieloautorskie. W materiałach zamieszczono również oświadczenia określające wkład, rodzaj zadań i zakres prac wykonanych przez współautorów publikacji. Z oświadczeń tych wynika, że w pracach tych udział Doktorantki był znaczący, zarówno w realizacji, jak i w opracowaniu manuskryptów publikacji, o czym świadczy fakt, iż we wszystkich tych pracach mgr Izabella

Kośka jest pierwszym autorem, jak również jednym z autorów korespondencyjnych, obok promotora rozprawy. Po czym przedstawia wyniki badań krótko omawiając kolejne publikacje włączone do pracy, krytycznie je analizuje przedstawiając zalety i wady opracowanych metod analitycznych. Po czym następuje podsumowanie i wnioski. Oprócz tego praca zawiera abstrakt, spis literatury i życiorys Autorki

Dostarczone dokumenty, zawierają również dorobek naukowy Doktorantki, w którym wymieniony jest Jej udział jako wykonawcy w projekcie badawczym w ramach Inicjatywy Doskonałości-Uczelnia Badawcza i kierownictwo Doktoranckiego Grantu Badawczego oraz odbycie krótkiego stażu w Rumunii w ramach International Summer School. Na uwagę zasługuje fakt, iż przedstawiona w dokumentacji lista publikacji zawiera również 2 publikacje z listy filadelfijskiej i 2 publikacje w ogólnopolskim czasopiśmie „Chemia w szkole", które nie wchodzą w skład rozprawy doktorskiej oraz kilkanaście referatów i komunikatów konferencyjnych. Jej prace były cytowane około 40 razy, a indeks h=4, zarówno wg bazy Scopus, jak i bazy WOS. Ponadto prowadziła zajęcia laboratoryjne dla studentów, brała udział w organizacji XI Polskiej Konferencji Analitycznej oraz udzielała się w pracy samorządu doktorantów, za co uzyskała cztery nagrody JM Rektora UL. Zdaniem recenzenta dorobek Doktorantki osiągnięty w krótkim przecież czasie studiów doktoranckich jest więcej niż znaczący.

Zasadniczym celem badań podjętych w ramach pracy doktorskiej było opracowanie nowych i precyzyjnych metod oznaczania wybranych leków weterynaryjnych. W przypadku fluorochinolonów dotyczyło to wykorzystania elektroforezy kapilarnej (CE) do oznaczania Cpx i Ofx w tkankach mięsa i moczu człowieka z zastosowaniem zatężania analitów wewnątrz kapilary za pomocą przejściowej izotachoforezy. Natomiast do precyzyjnego oznaczania AZN i AZL, opracowania procedury oznaczania za pomocą chromatografii cieczowej.

W pierwszym etapie badań Pani mgr Izabella Kośka zbadała możliwość wykorzystania elektroforezy kapilarnej do analizy zawartości fluorochinolonów (Cpx i Ofx) w mięsie (praca DI) i w moczu (praca D2). Jest to metoda powszechnie uważana za przyjazną dla środowiska przede wszystkim dlatego, iż używa się w niej niewielkich ilości rozpuszczalników, czyli nie generuje dużych ilości odpadów. Jednak ze względu na niewielką ilość próbki i krótką drogę

optyczną charakteryzuje się niską czułością stężeniową. Z tego powodu konieczne jest wprowadzenie etapu odpowiedniego przygotowania próbki umożliwiającego zarówno wydzielenie, jak i zatężenie analitu. Opracowała, nową nieopisaną w literaturze procedurę oznaczania Cpx i Ofx za pomocą CE z detekcją UV-Vis, z wykorzystaniem przejściowej pseudo-izotachoforezy do zatężania analitów w kapilarze. Ponadto dla próbek mięsa wykorzystała ekstrakcję ciecz-ciecz oznaczanych związków. Po przeprowadzeniu optymalizacji opracowaną procedurę poddała walidacji wyznaczając między innymi LOD i LOQ, wewnątrzdniową i międzydniową precyzję i dokładność metody. Uzyskane limity wynosiły odpowiednio 0,3 nmol/g dla Cpx i 0,1 nmol/g dla Olx oraz 0,8 nmol/g dla Cpx i 0,3 nmol/g dla Olx. Opracowaną i zwalidowaną procedurę zastosowała do oznaczania tych fluorochinolonów w tkankach wątroby drobiowej, kaczki i indyka oraz nerki kaczki i indyka (praca DI). Tę samą procedurę zmodyfikowała w celu wykorzystania do oznaczania tych antybiotyków w moczu ludzkim. Zmodyfikowaną i zoptymalizowaną procedurę również poddała walidacji wyznaczając LOD i LOQ, które wyniosły odpowiednio 0,05 nmol/ml dla Cpx i 0,01 nmol/ml dla Olx oraz 0,2 nmol/ml dla Cpx i 0,05 nmol/ml dla Olx. Uzyskała również dobrą dokładność pomiarów, w zakresie 86,4-102,6%, i precyzję w zakresie 1,4-7,8% dla próbek moczu, wzbogaconych przez analizowane związki, uzyskanych od 6 ochotników. Stwierdziła zatem, że opracowana metoda może być wykorzystana do analizy próbek rzeczywistych. W celu zwiększenia czułości metody i uproszczenia procedury analitycznej dotyczącej oznaczania tych antybiotyków w próbkach tkanek mięsa podjęła próbę zastosowania ekstrakcji do fazy stałej z wykorzystaniem modyfikowanych nanocząstek magnetycznych (praca D4). Nanocząstki Fe304 modyfikowała krzemionką z przyłączonymi do niej łańcuchami węglowodorowymi (C-18). Sorbenty te przygotowała we współpracy z pracownikami Katedry Technologii i Chemii Materiałów Wydziału Chemii UL. Sorbenty te wykorzystała do wydzielania analitów z homogenizowanych tkanek mięsa w buforze fosforanowym. Natomiast analizę wykonywała za pomocą CE według warunków opracowanych wcześniej. Całą procedurę poddała walidacji uzyskując dobra precyzję i dokładność pomiarów, co sugeruje że metoda ta może znaleźć praktyczne zastosowanie w oznaczaniu tych antybiotyków w próbkach mięsa. Wymaga to jednak dodatkowych badań, szczególnie w zakresie opracowania procedury on-line.

Natomiast praca D3 dotyczy opracowania procedury jednoczesnego oznaczania często podawanego zwierzętom leku uspokajającego AZN i jego metabolitu AZL z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-VIS. Opracowaną metodę zwalidowała uzyskując zarówno dobre wartości LOD i LOQ, jak i dobrą powtarzalność i precyzję. Metodę tę zastosowała do analizy wzbogaconych w te substancje próbek nerek i wątróbek wieprzowych zakupionych od lokalnych hodowców mięsa. Dodatkowo sprawdziła tzw. zieloność proponowanej procedury, co jest istotne z punktu widzenia jej wykorzystania do rutynowych analiz mięsa. Wykazała, że „zieloność" tej procedury jest podobna do innych metod chromatograficznych, HPLC-FL i HPLC-MS/MS, wykorzystywanych w tym celu. Uzyskane wyniki i dobra powtarzalność (RSD w zakresie 1,0 — 5,8%) wskazują, ze procedura ta może znaleźć zastosowanie w rutynowej analizie mięsa.

Nie mam większych zastrzeżeń dotyczących merytorycznej strony publikacji przedstawionych do oceny jako rozprawa doktorska. Prace te zostały bowiem gruntownie ocenione przed opublikowaniem przez odpowiednich recenzentów, tym bardziej że zostały opublikowane w czasopismach o wysokiej renomie.

Niemniej jednak mam następujące uwagi/pytania do dyskusji:

1 . Czy uzyskane limity oznaczalności i detekcji (LOD i LOQ) są porównywalne do tych opisanych w literaturze, czy też lepsze/gorsze i dlaczego? Brakuje mi tych informacji w pracy, czy publikacjach.
2. Jaka jest selektywność opracowanych procedur analitycznych, co jest szczególnie ważne w analizie skomplikowanych próbek biologicznych.
3. Czy rozważała Pani możliwość zastosowania wysoce selektywnych sorbentów z odciskiem molekularnych (MIPów) do ekstrakcji leków, na przykład na bazie modyfikowanych nanocząstek magnetycznych?

Na podstawie lektury publikacji wchodzących w skład rozprawy przypuszczam, że Doktorantka sprawnie posługuje się językiem angielskim. Na uwagę zasługuje również fakt, iż Autoreferat jest bardzo dobrze napisany i zawiera tylko nieliczne drobne błędy literowe i niezręczne sformułowania.

Poniżej wymieniam zauważone błędy i niezręczne sformułowania:

str. 3: „SEF współczynnik wzpomnienia czułości" ?

str. 8: czy cyprofloksacyna zawiera kwas karboksylowy? Chyba powinno być: grupę karboksylową

str. I l : , .kolejne generacje chinolonów wprowadziły do pierścieni..." ?

str. 18: powinno być: „...roztworu metanolu i suszono...."

str. 21: powinno być: , . przeprowadził.. ."str.

29: powinno być: . przenoszono z

Podsumowując z przyjemnością stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioskowania wskazują, że mgr Izabella Kośka wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań z zakresu chemii analitycznej, a szczególnie opracowania nowych procedur monitorowania obecności leków w próbkach żywności i płynach fizjologicznych. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Izabelli Kośki stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy

Biorąc pod uwagę fakt, że jest to praca nowatorska, dojrzała, będąca dorobkiem przemyśleń i systematycznych badań oraz jej wysoki poziom naukowy wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Izabelli Kośki. Autorka wykazała bowiem, że możliwe jest zastosowanie prostych dostępnych w typowych laboratoriach kontroli jakości żywności metod oznaczania leków w próbkach mięsnych. Jestem również pod wrażeniem dużego dorobku naukowego Doktorantki. Współautorstwo 8 publikacji, w tym 6 w czasopismach z Listy Filadelfijskiej i kilkunastu komunikatów konferencyjnych, w tym 1 ustnego, osiągnięte w krótkim czasie studiów doktoranckich są tego ewidentnym potwierdzeniem. Na uwagę zasługuje również Jej zaangażowanie w dydaktykę i prace organizacyjne Wydziału.

P. Alexander