

dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ  
Uniwersytet Łódzki  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska

## Recenzja

rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Jadwigi Musiał, zatytułowanej  
*Nowe podejście w izolowaniu i identyfikacji związków psychoaktywnych  
(dopalaczy) w materiale biologicznym*

### Wstęp

Przedstawiona do recenzji praca doktorska została przygotowana w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky, Wydziału Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem prof. dr hab. Renaty Gadzała-Kopciuch oraz w Instytucie Genetyki Sądowej w Bydgoszczy pod opieką naukową dr. n. med. Jakuba Czarny. Rozprawa doktorska mgr Jadwigi Musiał obejmuje wykorzystanie techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HPLC-MS/MS) w badaniu ponad 500 substancji psychoaktywnych, leków i ich metabolitów izolowanych z próbek biologicznych takich jak mocz, krew i włosy. Podjęta przez Doktorantkę tematyka badań jest aktualna, gdyż w ostatnich latach obserwuje się duży wzrost zainteresowania nowymi substancjami psychoaktywnymi określanymi nazwą dopalaczy, których zażywanie prowadzi do zatruc, zgonów, a także wypadków drogowych. Pojawiające się w sprzedaży nowe substancje psychoaktywne są ogromnym zagrożeniem dla zdrowia i życia zażywających je osób, a obserwacje wykazują, że przyjmują je coraz młodsi ludzie. Próby ograniczenia dostępności tego typu środków w legalnej sprzedaży skutkują wprowadzaniem na rynek kolejnych substancji, które są modyfikacjami strukturalnymi już znanych związków, przez co znajdują się one poza zasięgiem organów ścigania. W związku z tym, bardzo ważnym jest posiadanie metod pozwalających na jednoznaczną identyfikację pojawiających się na rynku nowości i zgłaszanie ich do wpisania na listę środków zakazanych. Dlatego prowadzone przez

Doktorantkę badania uważam za w pełni uzasadnione i ważne z punktu widzenia poznawczego i praktycznego.

### **Struktura rozprawy doktorskiej**

Rozprawa doktorska mgr Jadwigi Musiał jest zwartym zbiorem czterech artykułów naukowych opublikowanych w czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* oraz jednego zgłoszenia patentowego. Układ dysertacji jest typowy i zawiera wykaz publikacji wchodzących w jej skład, autoreferat, kopie wszystkich artykułów stanowiących cykl i opatrzone dodatkowym komentarzem, wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz oświadczenia współautorów. W dostarczonych do oceny dokumentach nie został załączony opis zgłoszenie patentowe, ale jest on dostępny na stronie internetowej Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej. Dysertacja rozpoczyna się od wykazu skrótów i oznaczeń, który znacznie ułatwia zapoznanie się z rozprawą, po którym Doktorantka podaje krótkie wprowadzenie w tematykę. W dalszej części jasno formułuje cel pracy, obejmujący opracowanie procedur analitycznych pozwalających na oznaczanie jak największej liczby substancji psychoaktywnych, leków i ich metabolitów w toku jednej analizy i krótkim czasie, w różnych matrycach biologicznych (krew, mocz i włosy). Ponadto zakłada, że opracowane metody zostaną wdrożone do rutynowych analiz próbek biologicznych pod kątem identyfikacji substancji psychoaktywnych, leków i ich metabolitów w laboratorium Instytutu Genetyki Sądowej w Bydgoszczy, co stanowi istotę doktoratu wdrożeniowego. W kolejnych rozdziałach przedstawia metabolizm wybranych grup związków psychoaktywnych oraz przegląd literatury odnoszący się do możliwości oznaczania tych związków w materiale biologicznym. W dalszej części opisuje opracowane przez siebie sposoby przygotowania próbek włosów, krwi i moczu do chromatograficznej analizy, dobór parametrów detekcji i separacji oraz walidacji opracowanych procedur. Całość pracy kończy podsumowaniem i wnioskami, spisem literatury oraz streszczeniami. Artykuły wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w bardzo dobrych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, o łącznym współczynniku oddziaływania z roku publikacji równym 19,5 oraz liczbie punktów MNiSW wynoszącej 380, a wraz ze zgłoszeniem patentowym 450. Wszystkie artykuły stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej to prace wieloautorskie, w których Doktorantka jest autorem pierwszym (2 prace) i/lub jednym z autorów korespondencyjnych, obok promotora rozprawy (3 prace). Załączone oświadczenia współautorów wskazują, że udział Doktorantki w przygotowaniu artykułów naukowych, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, był jasno określony i kluczowy. Dodatkowo recenzowana rozprawa zawiera opis pozostałych naukowych osiągnięć Doktorantki, na które składa się jedno wystąpienie ustne oraz siedem doniesień posterowych prezentowanych na



międzynarodowych i krajowych konferencjach. Dorobek publikacyjny i wystąpienia na konferencjach jednoznacznie wskazują na wysokie zaangażowanie Doktorantki w działalność naukową, a zgłoszenie patentowe świadczy, że włącza się Ona w komercjalizację uzyskanych wyników.

### **Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej**

Oceniana rozprawa doktorska to cykl obejmujący zgłoszenie patentowe (D4) i cztery artykuły naukowe, w tym trzy publikacje eksperymentalne (D2, D3 i D5) i jedną przeglądową (D1). W pierwszym etapie badań mgr Jadwiga Musiał prześledziła światową literaturę naukową na temat związków psychoaktywnych, w szczególności ich przemian w organizmach żywych i dostępnych sposobów oznaczania metodami chromatografii gazowej i cieczowej oraz elektrochemicznymi, a wyniki tych prac przedstawiła w artykule przeglądowym (D1). W publikacji tej szczegółowo scharakteryzowała wykorzystywane techniki ekstrakcyjne takie jak ekstrakcja do fazy stałej, ekstrakcja ciecz-ciecz i ekstrakcja z wykorzystaniem polimerów z odciskiem cząsteczki do przygotowania próbek do oznaczania w nich substancji psychoaktywnych. Przeprowadzona analiza i ocena opisanych w literaturze metod doprowadziła Doktorantkę do określenia istniejących luk w obecnym stanie wiedzy i pozwoliła na wytyczenie dalszego kierunku badań. Następnie mgr Jadwiga Musiał, opracowała trzy metody umożliwiające identyfikację i oznaczanie substancji psychoaktywnych, leków i ich metabolitów w próbkach włosów (D2), krwi (D3) i moczu (D5), w oparciu o technikę HPLC-MS/MS. Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z trudnym wyzwaniem, to jest pracą ze złożonym materiałem biologicznym, do którego zaliczane są mocz, krew i włosy, a w celu oczyszczenia i odbiałczenia próbki oraz uproszczenia matrycy zastosowała ekstrakcję ciało stałe-ciecz (D2) i ciecz-ciecz (D3 i D5). Chcąc wyeliminować efekt matrycowy, końcowe ekstrakty poddawała rozcieńczeniu, a krzywe kalibracyjne przygotowała w ekstraktach matrycowych. Za bardzo dobre rozwiązanie uważam podejście mające na celu uproszczenie procedur przygotowania próbki i zastosowanie jednego etapu ekstrakcji dla wielu związków różniących się znacznie właściwościami. Takie podejście skraca czas poświęcony na przygotowanie próbki, co jest bardzo ważne w przypadku badań rutynowych grup o dużej liczebności. Należy również docenić ogrom włożonej pracy eksperymentalnej na etapie rozwijania metod to jest wyznaczenia optymalnych warunków detekcji i separacji dla 522 analitów w przypadku krwi, 517 substancji we włosach i 477 w moczu. W trakcie tych prac Doktorantka wybrała właściwe wartości potencjału wejścia i wyjścia, energii zderzeń i potencjału rozgrupowania klasterów oraz pary jonów (prekursor i jon potomny) dla pracy w trybie monitorowanie reakcji wielokrotnych (MRM). Poświęciła dużo uwagi doborowi warunków chromatograficznych i przetestowała różne kolumny oraz składy faz ruchomych. Następnie, Doktorantka opracowane

procedury poddała walidacji, wyznaczając liniowość, precyzję, dokładność i błąd systematyczny (BIAS) metody, granicę wykrywalności i oznaczalności, wpływ matrycy i stabilność analitów. W kolejnym etapie badań zastosowała je do analizy próbek biologicznych pod kątem obecności i identyfikacji substancji psychoaktywnych. Dla prawie wszystkich analitów w opracowanych metodach (D2, D3 i D5) Doktorantka uzyskała parametry walidacyjne spełniające kryteria stawiane metodom analitycznym, wskazane w wytycznych Naukowej Grupy Roboczej ds. Toksykologii Sądowej (ang. *Scientific Working Group for Forensic Toxicology - SWGTOX*). Dodatkowo opracowane procedury poddała badaniom biegłości, co pozwoliło na wdrożenie ich do rutynowych analizach w Instytucie Genetyki Sądowej w Bydgoszczy. Uzyskana metodyka stanowi podstawę zgłoszenia patentowego (D4). Podczas standardowych badań prowadzonych w Instytucie opracowana metoda została wykorzystana do analizy 70 próbek moczu pochodzących od kierowców. Uzyskane rezultaty potwierdziły obecność leków i substancji psychoaktywnych w 52 próbkach. Wśród wykrytych związków znajdowały się między innymi: paracetamol, amfetamina, GHB, pochodna THC, metamfetamina, morfina, kodeiny, katyny i inne związki.

Podsumowując analizę rozprawy doktorskiej mgr Jadwigi Musiał, stwierdzam, że dysertacja reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera elementy nowości naukowej, a założony cel badania został w całości osiągnięty. Do najważniejszych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć:

1. Opracowanie selektywnych i czułych metod identyfikacji i oznaczania, w jednej analizie, wybranych substancji psychoaktywnych, ich metabolitów i leków w próbkach włosów, krwi i moczu (D2, D3 i D5).
2. Zaproponowanie prostych metod przygotowania próbek ograniczających zastosowanie toksycznych rozpuszczalników i skracających całkowity czas analizy (D2, D3 i D5).
3. Weryfikacja uzyskanych procedur analitycznych w badaniach międzylaboratoryjnych (badania biegłości).
4. Wdrożenie opracowanych metod do rutynowych analiz w Instytucie Genetyki Sądowej w Bydgoszczy.
5. Udział Doktorantki w komercjalizacji wyników badań poprzez współautorstwo zgłoszenia patentowego (D4).

### **Uwagi i pytania**

Recenzent ma za zadanie podkreślenie zarówno zalet, jak i wskazanie niedociągnięć czy błędów. Praca mgr Jadwigi Musiał została przygotowana starannie, a znajdujące się w niej opisy są czytelne



i napisane poprawnym językiem chemicznym. Jednakże za niefortunne uważam użycie określenia „ilość” w stosunku do rzeczowników policzalnych np. „ilość znanych już nowych substancji psychoaktywnych” (str. 22), „ilość analitów” (str. 18, 28, 63, 140), „ilość i wielkość kulek” (str. 31), czy sformułowania „Dla powyższych parametrów przyjęto zgodnie z wytycznymi granicę  $\pm 20\%$ .” (str. 64-65 i 255). Autorka nie uniknęła też błędów literowych np. na str. 27 „koluminek SPE” zamiast „kolumienek SPE”, na str. 29 „ekstrakcji” zamiast „ekstrakcji” czy na str. 42 „etabolitów” zamiast „metabolitów” i edytorskich w postaci niedokończonego zdania na str. 27 „Wraz ze wzrostem zainteresowania NPS wśród społeczeństwa, a także koniecznością przeciwdziałania rozprzestrzeniania się pozornie bezpiecznych dopalaczy.”.

Z ciekawości recenzenta proszę natomiast o wyjaśnienie następujących kwestii:

1. Jaką rolę pełnił etap wymrażania ekstraktu podczas przygotowania próbki do analizy?
2. Czy rozważała Pani możliwość zastosowania hydrolizy kwasowej włosów na etapie przygotowania próbki? Czy ten proces może zwiększyć uwalnianie badanych substancji z matrycy?
3. W jaki sposób zorganizowała Pani badania między laboratoryjne opracowanych metod?

Zasadniczo strona formalna pracy nie budzi zastrzeżeń, wobec czego stwierdzam, że Doktorantka opanowała podstawy warsztatu pisanie prac naukowych.

### **Wnioski końcowe**

Po zapoznaniu się z przedstawionymi do recenzji materiałami stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Jadwigi Musiał, na którą składa się spójny tematycznie cykl zawierający zgłoszenie patentowe i cztery artykuły opublikowane w renomowanych czasopismach z bazy *Journal Citation Reports*, dotyczy bardzo aktualnego i istotnego z praktycznego punktu problemu identyfikacji substancji psychoaktywnych w próbkach biologicznych. Praca stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje wiele elementów nowości naukowej. W moim przekonaniu rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane tego typu pracom w świetle obowiązujących przepisów (art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2023 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jedn. Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późniejszymi zmianami)). W związku z tym wnioskuję o dopuszczenie mgr Jadwigi Musiał do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę dużą liczbę wykonanych prac doświadczalnych, wysoki poziom zrealizowanych badań odnoszących się do identyfikacji i wykrywania związków psychoaktywnych w skomplikowanych matrycach biologicznych i udokumentowanych publikacjami w czasopismach

o wysokim współczynniku oddziaływania oraz wdrożeniem otrzymanych procedur w laboratorium Instytutu Genetyki Sądowej w Bydgoszczy, wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Jadwigi Musiał.

Grażyna Chwałko