

РЕЦЕНЗИЯ

от доц. д-р Румяна Стаматова Милина-Димитрова

на дисертационния труд на химик Надежда Атанасова Стоилова на тема:

„Определяне на хинолони в храни с животински произход чрез течна хроматография с флуоресцентно детектиране и масспектрометрия”

за придобиване на образователната и научна степен „доктор” по научната специалност 4.2 Химически науки (Аналитична химия)

Представеният ми за рецензия дисертационен труд е с тематика, свързана с разработване на метод за анализ на хинолони в проби от животински произход, съдържащ всички етапи от предварителна подготовка на пробата до получаване на качествени и количествени резултати и доказване на тяхната достоверност.

Актуалност на дисертационния труд

Хинолоните, които са синтетични противомикробни средства, притежават бактериостатичен и бактерициден ефект и стимулират растежа на животните. Поради това те широко се използват във ветеринарната практика за третиране и превенция на заболявания у животните.

Употребата в Европейския съюз (ЕС) на ветеринарни лекарствени продукти, съдържащи активните вещества хинолони, включително флуорохинолони, за животни, от които се произвежда храна, е въпрос, който буди загриженост поради въздействието на активните вещества върху развитието на резистентност към тази категория агенти. Продуктите, получени от тези животни (месо, мляко, мазнини и др.), носят риск за здравето на потребителите, ако тези продукти съдържат остатъчни количества хинолони. Редица регламенти на ЕС, излизащи почти всяка година през последните около 15 години, съдържат указания за изменение и допълнение на максимално допустимите граници на остатъчни вещества от ветеринарномедицински препарати, в това число хинолини, в храните от животински продукти, естеството на остатъчното вещество, животинските видове и тъканите от тях. В основата на необходимите за тези цели научни изследвания и контрол стоят методите за анализ на ниски концентрации хинолони в различни матрици.

Съществуващите в научната и специализираната литература методи за анализ се отнасят за определени хинолони в определени матрици и включват различни техники за инструментален анализ. Няма метод за едновременно определяне на голям брой хинолони в проби от животински произход. Разработването на такъв метод би съкратило времето за подготовка на пробите, би намалило разходите на реактиви и материали и цената на

анализа като цяло. Гарантирането на качеството на получените резултати е задължително условие за прилагането на всеки нов метод за анализ.

В този смисъл представената ми за рецензия дисертация е актуална с оглед на избраната тема, а също така научно и приложно интересна, методологично и методично полезна.

Общ преглед на дисертационния труд

Дисертацията е написана в обем 154 стр. Тя съдържа основните необходими за всеки дисертационен труд раздели – „Увод“ (3 стр.), „Литературен обзор“ (62 стр.), „Разработване на метода (Експериментална част)“ (14 стр.), „Резултати и обсъждане“ (36 стр.), „Основни приноси“ (14 стр.) и „Библиография“ (12 стр.).

Като допълнителна информация са добавени и списък на научните публикации, на участия в научни конференции, списък на цитати върху научните публикации. Дисертационният труд е онагледен с 11 таблици и 8 фигури, които като цяло оставят приятно впечатление с доброто си качество и информационна достъпност.

Познаване на естеството на проблема и творческа оценка на литературния материал

Литературният обзор обхваща 62 страници. В работата са използвани 164 литературни източници, като само малка част от тях (7,3 %) са публикувани преди 2000 г. Това показва актуалността на информацията и целевия подход към нея.

Тази информационна част доминира като обем над другите по-съществени части (Експериментална и Резултати). Обяснявам си това с желанието на дисертантката да обхване всички обекти, в които се намират и определят хинолини. В тази връзка имам следните забележки: считам за излишна т. 1.2.1 в частта си, касаеща определяне на хинолони във води, урина и др. обекти, които не са цел на дисертацията; т.1.2.8, описваща недостатъците на съществуващите методи е излишно обширна и повтаря някои положения, посочени вече в литературния обзор и изводите; считам, че не е необходимо да се посочват фирмите-производители на използваната в литературните източници техника.

Много добро впечатление прави това, че обзорът завършва с извод какво е постигнато от други автори по темата, какво не е направено и какво следва да се реши от дисертантката.

Селекцията на литературните източници и показаното оценяване на литературния материал води до извода, че Н. Стоилова познава много добре състоянието на разглеждания проблем, което от своя страна допринася за прецизиране на целта на работата и конкретизиране на основните задачи.

Предмет на дисертационния труд

Предмет на дисертацията е да се разработи чувствителен и селективен метод за едновременно определяне на девет контролирани хинолина в матрици от животински произход, указани в Наредба № 37/2010. Унифицирането на отделните етапи, свързано с използване на нови техники, да се води в посока висока чувствителност и надеждност на метода, съкращаване на времето за анализ и икономия на реактиви и материали. Методът да бъде валидиран съгласно правилата, изисквани от Решение на Комисията 2002/657/ЕС.

Кратка аналитична характеристика на материала

Раздел I включва увод, литературен обзор и изводи от него, които са основа за изграждане на концепцията за изследователската работа. Логично изведени от това са целта и задачите на дисертационния труд. Някои мои препоръки към този раздел посочих по-горе.

Раздел II (Експериментална част) е посветен на използваните техники, апарати и други средства за проведените експерименти. Последователно са описани проведените опити за всеки отделен етап от анализа. Прави впечатление прилагането на различни техники за екстракция и последващо очистване, включително твърдофазова екстракция (ТФЕ) – сравнително нов и много подходящ метод за подготовка на проби за хроматографско измерване, подбор на пълнежи за твърдофазовата екстракция, съобразно изследваните обекти, колони и детектори за хроматографския анализ.

Много добре е описано изпълнението на процедурите по валидиране на метода – избор на валидационни параметри и тяхното значение като доказателства за удостоверяване на метода. Приложеният подход в тази област изисква задълбочено познаване на валидационните параметри, необходимите граници, начините за изразяване и определянето им и тяхното значение за предлагания анализ. Проличава, че Стоилова разбира добре материала в тази част, описаните процедури правилно включват необходимите стъпки, които в следващия раздел на дисертационния труд са тълкувани и параметрите са доказани. Считам, че принос за това има и проведеното от дисертанта обучение по системи за качество, методи за изпитване, калибриране, статистика и др. подобни, в България, Швейцария и Германия.

Изложението както в този, така и в следващите раздели на дисертационния труд би спечелило, ако дисертантката използва български думи, а не побългарени английски – напр. „картридж“, който се „еквалибрира“, „не-услужлива“ проба, „контаминиране“, „тайлинг“, „виал“ и др. подобни.

Раздел III е основен в дисертацията и в него са изложени и обсъдени резултатите, получени от обработката на експерименталните данни.

Проведено е оптимизиране на всички етапи на анализа, от гледна точка на поставената цел. Това е трудна задача, тъй като етапите са няколко и всяка промяна в който да е от тях изисква правилно решение на основа на предварителни познания за обектите и процесите, както и показване на получените резултати чрез проследяване на един или повече критерии за ефективност, матричен ефект, хроматографско разделяне и детектиране. Тези дейности са извършени, получените данни са обработени и представени в подходящ вид:

1. Оптимизиран е етапът на екстракция, като са потърсени условия за възможно най-пълно извличане едновременно на 9-те изследвани хинолони в различни матрици. Част от матриците съдържат мазнини, други – протеини и ензими. Хинолоните също се различават по свойства – едни са кисели, други имат базичен характер. Това затруднява намирането на екстракционна техника, еднакво добра за изследваните съединения и матрици. На основата на добро познаване на екстракционните техники, както и на свойствата на изследваните хинолони са проведени опити с вариране на вида и обема на екстрахиращи разтворители, на броя на екстракциите и други условия и са проследени критериите за ефективност. Като резултат е разработен нов етап за едновременно екстрахиране на изследваните съединения с аналитичен добив между 60 и 95 %.
2. Оптимизиран е етапът за очистване и концентриране на екстракта преди въвеждането му в апарата за течна хроматография. За целта е приложена твърдофазова екстракция. Използван е патрон с пълнеж N-винилпиролидон – дивинилбензен (HLB), за който има данни в литературата, че е подходящ за субстанции с кисели, неутрални и базични свойства. Отново с цел получаване на висок аналитичен добив за 9-те хинолони, са установени разтворителите за кондициониране, условията за равновесие, промиване и елуиране. Трябва да се подчертае, че в литературата почти липсват данни за прилагане на този пълнеж за изследваните вещества, още по-малко за едновременното им концентриране. При установените от дисертантката условия за ТФЕ, аналитичният добив за всички изследвани съединения е около 100 %. Проведено е оценяване на матричния ефект от различните тъкани при този етап от анализа. Предложена е процедура за очистване и концентриране на екстракта.
3. Оптимизиран е етапът на същинския анализ с високоефективна течна хроматография с флуоресцентен детектор (ВЕТХ – ФД). Тук са изследвани различни типове хроматографски колони, подвижни фази и режим на елуиране. Не е посочено директно, но се подразбира, че дисертантката е търсила условия за анализ, включително колона с пълнеж, осигуряващ симетричност на пиковите. За достигане на добро разделяне са разработени и тествани програми за градиентно елуиране и промяна на дължините на вълните на детектора. С таблици и фигури са показани получените резултати и е доказан изборът на оптимални условия за ВЕТХ

- ФД анализ. Много добро постижение е и факта, че предлаганите условия водят до икономии на разтворители и намаляване на времето за анализ.
4. Предложен е вариант на анализ с ВЕТХ с маспектрална детекция (МС/МС). Изследвани са ново поколение хроматографски колони за ВЕТХ-МС/МС и са установени условия за добро разделяне на изследваните съединения. Предложени са параметри за МС/МС детектиране.
 5. Методът е валидиран по изискванията на Решение на Комисията 2002/657/ЕС. Определени са параметрите на валидиране за всеки от деветте хинолона за всяка от изследваните матрици. Получените стойности са дадени в таблици. Към тази част на работата имам следната забележка: В някои от таблиците се повтарят едни и същи валидационни параметри, напр. „Аналитичен добив“ в Табл. 4 и 5, ССа и ССβ в Табл. 11 и Табл. 6-9.

Научни и научно-приложни приноси

Разглежданите в дисертацията въпроси са съставна част от всяко задълбочено изследване, свързано със създаването на метод за анализ. Получените нови резултати и факти са със значителна стойност поради трудностите, съпътстващи решаването на проблемите на анализа на ниски количества вещества в сложни и трудни матрици и са отразени в научните и научно-приложни приноси. Те са формулирани в 8 точки. Считаю, че т.6 е по-правилно да е подточка на предходната. В дисертацията са включени резултати за първи път. Това е на първо място разработеният нов метод за анализ едновременно на 9 контролирани хинолони в проби от животински произход с доказани характеристики за валидността на получените чрез него качествени и количествени резултати. Определен принос е и предложените от дисертантката МС/МС параметри за детектиране, които позволяват потвърдителен анализ. Методът вече се прилага в рутинната работа на ЦЛВСЕЕ и е включен в обхвата на акредитация на Националната Референтна Лаборатория.

От така дефинираните приноси става ясно, че поставените задачи в дисертацията са решени и основната цел е постигната.

Публикации и цитати

Представени са 5 публикации във връзка с темата на дисертацията, от които 3 са в международни издания, 2 - в издания с импакт фактор. Във всички публикации дисертантката е на първо място. Части от дисертацията са докладвани с постер на научна сесия по проект „Наука и бизнес“.

Забелязани са общо 16 цитата на статиите в дисертационния труд.

Убедена съм, че постиженията, изложени в дисертацията са в голяма степен лично дело на дисертантката, което става ясно от представените публикации и цитати.

Автореферат

Авторефератът е подготвен съгласно изискванията и е със структура и съдържание, съответстващи на дисертационния труд.

Забележки, препоръки и въпроси

Посочените в разделите забележки не са от принципно значение и имат характер на препоръки. Те не променят общото много добро впечатление от дисертационния труд.

Изследваните 4 колони за МС анализ биха могли да се приложат и при флуоресцентна детекция. Проведени ли са такива изследвания и ако да, какви резултати се получават?

Как обяснявате и доказвате твърдението си, че МС/МС методът е по-чувствителен и по-надежден в сравнение с флуоресцентното детектиране?

Заклучение

Въз основа на изложеното в рецензията считам, че така представеният дисертационният труд съдържа значими научни и приложни приноси и е структуриран съгласно изискванията на Закона за развитие на академичния състав и Правилника за придобиване на научни степени и заемане на академични длъжности в ХТМУ. Това ми дава основание убедено да предложа на членовете на Научното жури да присъдят на Надежда Атанасова Стоилова образователната и научна степен „доктор“ по научната специалност 4.2 Химически науки (Аналитична химия).

20.06.2015

Гр. Бургас

Рецензент:



(доц. д-р Р. Милина)