



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

Prof. dr hab. Jadwiga Mielcarek  
ul. Grunwaldzka 6  
60-780 Poznań

tel.: 61 854-66-06  
fax: 61 854-66-09

Poznań 01.09.2016 r.

### Recenzja pracy doktorskiej

pt. “ Ekstrakcyjne metody wydzielenia wybranych leków przeciwhistaminowych i ich analiza w próbkach środowiskowych”, wykonanej przez Panią **mgr Iwonę Kiszkiel-Taudul** w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu w Białymstoku pod kierunkiem promotora - Pani dr hab. Barbary Starczewskiej, prof. UwB oraz promotora pomocniczego Pani dr Barbary Leśniewskiej

### Podstawa wykonania recenzji

Recenzję pracy doktorskiej opracowano na podstawie zlecenia uchwały Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku z dnia 7 lipca 2016 roku oraz pisma Dziekana Wydziału Pani dr hab. Iwony Ciereszko, prof. UwB z dnia 12.07.2016 roku, dostarczonego egzemplarza rozprawy doktorskiej oraz ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 ze zm.).

### Charakterystyka i ocena pracy doktorskiej

Tematyka recenzowanej rozprawy wpisuje się w bardzo aktualne tendencje ponieważ skażenie środowiska naturalnego jest poważnym problemem i stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia ludzi, a także ekosystemów. Inne ważne zagrożenia środowiskowe, m.in. zmiany klimatyczne są również powodowane przez skażenie środowiska. W przyszłości – związane z tym problemy - mogą ulec jedynie zaostrzeniu w wyniku wzrostu liczby ludności i dążenia do wyższego standardu życia. Jednocześnie należy podkreślić, że w ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój świadomości społecznej i troski o stan środowiska, a rezultatem są działania skierowane w celu eliminacji różnorodnych źródeł zanieczyszczenia. Z tego względu temat realizowanej pracy doktorskiej jest bardzo interesujący, aktualny i uzasadniony.

Zakres wykonanych badań jest tematycznie związany z profilem prac prowadzonych od wielu lat w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej, w zespole Pani prof. Barbary Starczewskiej, dotyczących analizy związków biologicznie aktywnych w próbkach środowiskowych i preparatach farmaceutycznych.

We wstępie Doktorantka przedstawia zasadność podjętego tematu, założenia i krótko charakteryzuje cel pracy. Jako cel główny podaje opracowanie warunków ekstrakcji umożliwiających wydzielenie z próbek wody, a następnie oznaczanie substancji aktywnych z grupy leków będących antagonistami receptorów histaminowych H<sub>2</sub>. Jako cele szczegółowe podano: (i) opracowanie procedury ekstrakcji z zastosowaniem związków powierzchniowo czynnych, (ii) modyfikację opracowanych metod z wykorzystaniem cieczy jonowych, (iii) modyfikację metody LC-MS/MS w celu jednoczesnego oznaczania analizowanych substancji w mieszaninie, (iv) weryfikację poprawności opracowanych procedur poprzez oznaczenie zawartości wybranych substancji leczniczych w próbkach wód naturalnych i ściekach.

Związkami do badań były – famotydyna, ranitydyna, nizatydyna oraz cymetydyna. Są to substancje farmakologicznie aktywne stosowane głównie w celu zmniejszenia wydzielania soku żołądkowego, w chorobie refluksowej, w chorobie wrzodowej żołądka i dwunastnicy, a także w innych stanach, w których występuje nadmierne wydzielanie kwasu solnego. Wybór związków do badań należy ocenić jako bardzo trafny ponieważ wymienione substancje czynne wchodzi w skład bardzo zróżnicowanych postaci leku, m.in. tabletek powlekanych, iniekcji, zawiesin. Ponadto są łatwo dostępne, co znajduje przełożenie na szerokie zastosowanie. Tematyka zagadnień poruszanych w części teoretycznej, właściwy i bardzo trafny dobór zaprezentowanych tematów, potwierdzają rozeznanie przez Doktorantkę szerokiego i bogatego piśmiennictwa.

W tym miejscu nasuwa się drobna uwaga, aby w odniesieniu do analizowanych związków stosować nazwy „substancje lecznicze” lub „substancje farmakologicznie aktywne”, które nie są synonimem definicji leku i nie powinno się ich używać zamiennie.

### **Strona formalna pracy**

Rozprawa zredagowana jest w powszechnie przyjęty sposób, napisana poprawnym językiem i przedstawiona aż na 243 stronach. Ponadto zawiera 65 rysunków, 56 tabel oraz zestawienie skrótów i stosowanych symboli. Spis piśmiennictwa obejmuje imponującą liczbę 245 pozycji, jednocześnie należy podkreślić, że w większości pochodzących z ostatnich 10-ciu lat. Szata graficzna jest niezwykle staranna, a dobrze opracowane ryciny i tabele zdecydowanie pomagają w zrozumieniu tekstu. Praca posiada typowy układ, a całość podzielona jest na 5

głównych rozdziałów. Ponadto zamieszczono również „Streszczenie” w języku polskim i angielskim, Wykaz tabel i rycin” oraz „Spis dorobku naukowego”.

### **Merytoryczna ocena pracy**

W celu opracowania najważniejszej części pracy, tj. wyników i dyskusji - Autorka zastosowała dwa narzędzia badawcze, tj. studia literaturowe oraz eksperyment. Założony plan zrealizowano, a w planowaniu jak i wykonaniu eksperymentu, wykorzystano wyniki badań prowadzonych wcześniej w Zakładzie. Interpretacja wyników została przedstawiona poprawnie, a uzyskane rezultaty stanowią osiągnięcie naukowe posiadające cechy nowości.

Doktorantka prowadziła badania dotyczące optymalizacji parametrów izolacji i wzbogacania, wybranych substancji leczniczych z grupy antagonistów receptorów histaminowych H<sub>2</sub>, z próbek wody. Zaplanowany zakres badań obejmował dobór adsorbentu do ekstrakcji oraz rozpuszczalników wykorzystanych do elucji analitów. Do oceny poprawności doboru warunków postępowania analitycznego wykorzystano metodę - spektrofotometryczną oraz chromatograficzną z różnymi rodzajami detekcji. Dla opracowanych procedur analitycznych zostały wyznaczone parametry walidacyjne. Program badań obejmował także ocenę próbek rzeczywistych, która polegała na analizie zawartości substancji leczniczych w naturalnych próbkach wodny źródlanej, wodociągowej, studziennej, a także ściekach.

Na podkreślenie zasługuje poszukiwanie i skuteczne opracowanie innowacyjnych metod ekstrakcji substancji leczniczych o działaniu przeciwhistaminowym do fazy stałej, które dotychczas nie posiadają doniesień literaturowych. Jak wiadomo w analizach środowiskowych, wybór odpowiedniej metody izolacji analitów jest ważnym, a jednocześnie trudnym etapem opracowania procedury analitycznej ponieważ tego rodzaju próbki zawierają liczne składniki matrycy, a stężenia oznaczanych substancji są często bardzo niskie. Jedną z technik możliwych do zastosowania w takich przypadkach, są techniki ekstrakcji do fazy stałej SPE, które były obiektem badań ocenianej rozprawy. Badania efektywności ekstrakcji obejmowały dobór materiału sorpcyjnego stanowiącego złożę wypełniające kolumnienki (Oasis HLB, SDB-1, Diol, Silica gel), rodzaj i objętość rozpuszczalników wykorzystywanych do elucji. Optymalizacja warunków izolacji i wzbogacania polegała na właściwym doborze parametrów mających wpływ na oddziaływanie analitów ze złożem. Doktorantce poprzez odpowiedni wybór udało się uzyskać powtarzalność i maksymalną wydajność ekstrakcji, przy jednoczesnym zachowaniu korzystnego czasu eksperymentu. W celu wydzielania i rozdzielania substancji leczniczych, oprócz klasycznej techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE), zastosowano technikę micelną, a także ekstrakcję cieczową wspomaganą

ultradźwiękami. Dużym wyzwaniem analitycznym było opracowanie warunków różnego rodzaju mikroekstrakcji tj. dyspersyjnej, poprzez emulgację oraz do pojedynczej kropli rozpuszczalnika.

Jednym z ważniejszych etapów rozprawy oprócz opracowywania nowych metod analitycznych, była ich walidacja, która zapewnia poprawność i rzetelność procesu analitycznego oraz pozwala uzyskać miarodajne wyniki. Walidacja uwzględniała takie parametry jak zakres liniowości, granicę wykrywalności i oznaczalności. Bardzo istotnym zagadnieniem analitycznym było ustalenie odzysku wyrażanego w procentach oraz współczynnika wzbogacania. W celu uzyskania wyższych współczynników wzbogacania przy równoczesnym obniżeniu granicy wykrywalności, do ekstrakcji wykorzystano związki powierzchniowo czynne, co umożliwiło mniejsze zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych.

#### **Uwagi i pytania recenzenta:**

1. Pierwsza uwaga dotyczy informacji zamieszczonej w części teoretycznej na str -52-, w której podano, że większość substancji biologicznie czynnych jest dobrze rozpuszczalna w wodzie. Zdaniem recenzenta wskazane byłoby bardziej szczegółowe określenie podanej informacji. Jak wiadomo bowiem, ponad 85% związków biologicznie czynnych to związki organiczne, z których zdecydowana większość nie wykazuje jednak dobrej rozpuszczalności w wodzie.
2. Na str - 66- podano, że ranitydyna i famotydyna należą do substancji stabilnych, trudno ulegających rozkładowi. Jak zaznaczono w rozprawie, informacje na temat trwałości ranitydyny i famotydyny zostały przez Doktorantkę podane na podstawie piśmiennictwa, a w szczególności wykorzystano wyniki badań opublikowane w 2005 roku przez Yunqi Wua i wsp. Niestety z pewnym rozczarowaniem należy przyznać, że wyniki badań wymienionych autorów zamieszczone w publikacji, która dość niefortunnie została wykorzystana przez Doktorantkę, nie są wiarygodne. Wymienieni autorzy oceniali i porównywali trwałość trzech substancji leczniczych - metronizadolu, chlorowodoru tetracykliny oraz famotydyny - w różnych warunkach przechowywania. Jednym z podanych wniosków jest stwierdzenie, że famotydyna wykazuje najmniejszą trwałość - i z tym się należy zgodzić. Natomiast należy mieć wątpliwości odnośnie rzetelności parametrów kinetycznych opisujących proces degradacji, które przedstawiono w tab. 4 wspomnianej publikacji. Jak wiadomo bowiem, większa wartość stałej szybkości rozkładu (k) wskazuje na szybszy rozkład, co powinno znaleźć przełożenie na większy procent

konwersji substancji (podane zależności są odwrotne). Natomiast inne doniesienia literaturowe wskazują, że chlorowoderek ranitydyny jest substancją labilną, łatwo ulegającą rozkładowi, szczególnie pod wpływem wilgoci i światła. Także monografie farmakopealne opisują chlorowoderek ranitydyny jako biało-żółtą substancję, którą należy „chronić przed światłem”. Bardzo często podkreśla się również, że w czasie przechowywania ranitydyny dostrzegane są zmiany barwy, substancja brązowieje, a dodatkowym efektem jest nieprzyjemny zapach. Wykazano, że ekspozycja chlorowodoru ranitydyny *in sub.* na znaczną wilgotność względną (75%), w krótkim czasie powoduje przemianę fazową; powstaje półstała, kleista postać o ostrym zapachu.

3. Wyjaśnienia wymaga informacja zamieszczona na str -65- na temat temperatury topnienia ranitydyny i famotydyny. Podano, że ranitydyna charakteryzuje się wysoką temperaturą topnienia. W tym miejscu wskazane byłoby zróżnicowanie – jakiej formy podane wartości dotyczą – czy substancji w postaci wolnych zasad, czy też ich soli w postaci chlorowodorów. Różnice są dość istotne, np. chlorowoderek ranitydyny topi się w zakresie temperatur 133-134 °C, a dla wolnej postaci zasady podawany jest zakres 69-70 °C.
4. W przypadku opisu warunków oznaczania nizatydyny w mieszaninie metodą spektrofotometryczną, wyjaśnienia wymaga rozbieżność wartości analitycznej długości fali; na str -91- oraz -95- podano różne wartości.
5. Kolejne pytanie dotyczy warunków oznaczania famotydyny i ranitydyny w mieszaninie metodą spektrofotometryczną (str-103-, rys. 32). Jak wynika bowiem z ryc. 27 (str-90-) absorbancja ranitydyny przy  $\lambda = 265$  nm, nie posiada wartości zerowej. Dlatego można zakładać, że w przypadku oznaczania mieszaniny substancji, absorbancja mierzona przy tej długości fali, jest wartością addytywną dla obu związków.

Od strony edycyjnej przedstawione opracowanie jest przygotowane bardzo starannie, w tekście znajdują się nieliczne usterki językowe i wyrażenia żargonowe, których przykłady z obowiązku recenzenta przytaczam.

Wyrażenia żargonowe:

str -98- „Analizę prowadzono na podstawie pola powierzchni pików przy czasie retencji...”

„Analizę prowadzono oceniając pole powierzchni pików posiadającego czas retencji...”

Błędy literowe: str -98-, str -100-

## **Podsumowanie**

Analiza przeczytanej rozprawy pozwala recenzentowi podkreślić szczegółową wiedzę Autorki, dotyczącą omawianego tematu. Materiał eksperymentalny zawarty w pracy jest niezwykle obszerny, tematyka jest bardzo szeroka i zawiera wiele interesujących wątków. Badania zostały poprawnie zaplanowane, a uzyskane wyniki są bardzo wartościowe. Autorka przeprowadziła właściwą analizę i interpretację uzyskanych wyników oraz wykazała wysoki stopień wiedzy ogólnej. Tematyka rozprawy jest bardzo aktualna i ważna zarówno w aspekcie poznawczym, jak i aplikacyjnym. Wymienione w recenzji uwagi są w dużej części propozycją do dyskusji i ewentualnego rozwinięcia i uzupełnienia na potrzeby publikacji.

W opinii recenzenta - praca bardzo znacznie wykracza poza ogólnie przyjęte wymagania ustawowe i zwyczajowe stawiane pracom doktorskim. W szczególności wnosi znaczny wkład do zastosowania metod ekstrakcyjnych w oznaczaniu pozostałości substancji leczniczych, których obecność w środowisku będzie wzrastała, a dostępność wiarygodnych metod ich oznaczania będzie niezwykle istotna. Poziom naukowy rozprawy oceniam jako bardzo wysoki, a ze względu na szeroki zakres przeprowadzonych badań na wyróżniający się.

Biorąc pod uwagę wszystkie przedstawione elementy oceny - wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Biologiczno-Chemicznego Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Ilony Kiszkiel-Taudul do publicznej obrony i dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
prof. Jadwiga Mielcarek