



UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
KATEDRA I ZAKŁAD CHEMII FARMACEUTYCZNEJ
ul. Grunwaldzka 6 tel. 061 854 66 47
60-780 Poznań fax 061 854 66 52



Prof. dr hab. Barbara Marciniak
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, ul. Grunwaldzka 6, 60-780 Poznań
e-mail: bmarcin@ump.edu.pl

Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Bartosza Kowalskiego
pt.: „Oznaczanie wybranych leków z różnych grup terapeutycznych w wodach
powierzchniowych z zastosowaniem technik chromatograficznych”
wykonanej w Katedrze Chemii Analitycznej i Ogólnej
Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej
pod kierunkiem prof. zw. dr hab. Ireny Staneczko-Baranowskiej

Społeczeństwa współczesne konsumują coraz więcej leków syntetycznych. Mimo, że leki są coraz droższe, ich produkcja i spożycie wzrasta z powodu wielu nakładających się przyczyn. Po pierwsze są łatwo dostępne, szybko i skutecznie działają a ich użytkownikami są coraz liczniejsze grupy społeczne nie występujące jeszcze 100 lat temu, a mianowicie ludzie niepełnosprawni, dzieci z wrodzonymi wadami genetycznymi oraz ludzie starsi, którzy coraz dłuższe życie zawdzięczają postępom medycyny. Możemy zatem żyć dużej i to bez bólu i licznych dolegliwości, lecz z drugiej strony pozostałości i metabolity leków stają się równie poważnym problemem zanieczyszczenia środowiska jak herbicydy, pestycydy czy tworzywa sztuczne. W tej sytuacji, aby ocenić skalę zjawiska potrzebne są czułe i specyficzne metody wykrywania i oznaczania pozostałości leków w żywności, wodach i ściekach.

Z tego punktu widzenia temat wybrany przez Doktoranta jest nadzwyczaj aktualny i ambitny, o potencjalnie dużych wartościach aplikacyjnych oraz poznawczych. Posiada także wysoki stopień trudności, wymaga długich szczegółowych badań oraz dobrej bazy aparaturowej nie mówiąc o odczynnikach specjalnej czystości czy wysokiej klasy kolumnach. Jest zatem tematem kosztownym czyli rzadko podejmowanym, bo wymaga sponsoringu. Te wszystkie progi trudności Doktorant mógł pokonać na Politechnice Śląskiej, gdzie w zespole prof. Baranowskiej podjął się opracowania chromatograficznych metod oznaczania

pozostałości leków w wodach powierzchniowych. A z pewnością wydatnie pomógł mu w tym grant w postaci projektu rozwojowego nr R05 037 03 przeznaczony do opracowania procedur przeznaczonych do oznaczania pozostałości środków przeciwbólowych i niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz β -blokerów w ekosystemach wodnych.

O stopniu trudności podjętego przez Doktoranta tematu decydują w tym przypadku wymagania stawiane metodom oznaczania pozostałości leków w wodach powierzchniowych, a były one wyjątkowo wysokie. Chodziło mianowicie o opracowanie metod do jednoczesnego i szybkiego wykrywania i oznaczania dużej liczby leków występujących w mieszaninach o niskich stężeniach rzędu μg lub ng/L oraz różniących się budową chemiczną i działaniem. Wprawdzie w literaturze można znaleźć wiele prób podejmowanych w tym samym celu, lecz od pracy Doktoranta różni je przede wszystkim niższy stopień trudności wynikający z mniejszej liczby rozdzielanych i oznaczanych leków pochodzących z mniejszej liczby grup chemicznych i terapeutycznych oraz mniejsza szybkość wykonania czyli dłuższy czas analizy oraz gorsza jakość rozdziału, a przy tym wszystkim mniejsza czułość, co w tego typu opracowaniach odgrywa decydującą rolę.

Tak wysoki przekrój wymagań postawiony w celu pracy mógł być zrealizowany tylko w doświadczonym, wysoko wyspecjalizowanym i perfekcyjnie zorganizowanym zespole badawczym, a do takich niewątpliwie należy placówka kierowana przez prof. Ireną Baranowską, zajmującą się od lat różnego typu technikami rozdziału i oznaczania związków chemicznych biologicznie czynnych oraz leków.

Doktorantowi udało się osiągnąć cel pracy przy użyciu udoskonalonych metod HPLC i UHPLC, gdzie po żmudnych i drobiazgowych badaniach nad porównaniem różnych parametrów kolumn chromatograficznych i kolumn do SPE, składem fazy ruchomej, technik przepływu, rodzajem detektorów oraz aparatów różnych producentów otrzymał wyniki godne pozazdroszczenia. Opracował bowiem metodę HPLC do jednoczesnego oznaczania 10 lub 13 leków oraz metodę UHPLC do oznaczania mieszaniny 15 leków, a każda z nich była poprzedzona opracowaniem jedno lub dwuetapowej metody wyodrębnienia i zagęszczenia badanych związków z wód powierzchniowych (rzek, jezior czy oczyszczalni ścieków) gdzie w równie dokładny sposób przetestował przydatność (jako % odzysku) różnych wypełnień do ekstrakcji z fazy stałej.

Rezultatem pracy jest zatem zaproponowanie przez Doktoranta:

- 3 rodzajów metod wyodrębniania i zagęszczania techniką SPE dla 10, 13 lub 15 różno - składnikowych mieszanin leków w wodach powierzchniowych
- 2 rodzajów chromatograficznych (HPLC i UHPLC) metod oznaczania w/w mieszanin

Opracowane metody wyodrębniania i zagęszczenia charakteryzowały się wysokim, bo > 90% odzyskiem badanych leków w przypadku szeroko stosowanego wypełnienia Oasis HLB i prawie równie wysokim na dwóch innych wypełnieniach zastosowanych i przetestowanych przez Autora tj. na wypełnieniu Bond Elut ENV i NEXUS.

Prawdziwym kunsztem analitycznym odznaczają się jednakże opracowane przez Autora metody rozdziału i oznaczania badanych związków, które z nawiązką spełniają wszelkie założone przez Doktoranta wymagania, są bowiem:

- **specyficzne** dla dużej liczby związków 10-15, ponieważ można przy ich pomocy oznaczyć każdy ze składników mieszaniny obok pozostałych
- **pozwalają na jednoczesne oznaczanie** wszystkich składników mieszaniny
- **posiadają wysoką czułość** umożliwiającą oznaczanie badanych leków na poziomie 1 µg lub ng/L
- **odznaczają się dużą szybkością** tzn. krótkim czasem oznaczania (dla metody HPLC w granicach od 11 do 20 min, a dla metody UHPLC około 2 min)
- **zapewniają dobrą jakość** rozdziału o ostrych pikach
- **charakteryzują się doskonałymi, bardzo niskimi wartościami limitów detekcji** (LOD = 0,004–0,183) i limitów oznaczania (LOQ = 0,013–0,548) oraz niskim błędem (SD = 0,005 – 0,194) i wysoką precyzją (Wz = 0,14-2,99)

Reasumując – rezultatem pracy mgr inż. Bartosza Kowalskiego jest przygotowanie doskonałego narzędzia do rozwiązania konkretnego problemu. A zatem w następnym etapie pracy Doktorant przetestował opracowane przez siebie metody na wodach rzek, jezior i oczyszczalni ścieków, których lista jest doprawdy imponująca. Otrzymane wyniki dostarczyły ciekawych i wiele dających do myślenia rezultatów. Przebadano bowiem szeroki wachlarz wód powierzchniowych takich jak wody rzeczne (Brda, Kłodnica, Krzywa, Mała Panew, Krutynia, Odra, Potok Toszewski, Troja, Skawa, Wełtawa i Wisła) oraz wody z jeziora Pławniowice i oczyszczoną wodę z oczyszczalni w Bielsku Białej.

Otóż z 15 przebadanych leków, najczęściej w różnego rodzaju wodach wykrywano naproksen i diklofenak, czyli leki przeciwbólowo-przeciwzapalno-przeciwreumatyczne w stężeniu ~ 0,3 µg/L. Wprawdzie wszystkie badane leki występują w stężeniach < 1µg/L tj. konkretnie w zakresie od 0,07 do 0,9 µg/L (najczęściej 0,1-0,2 µg/L) jednakże najwyższe stężenia wykrywanych leków reprezentują kwas acetylosalicylowy i metamizol sodowy (0,7-0,9 µg/L).

Jest to o tyle niespodziewane, że oba te leki odznaczają się małą odpornością na działanie kwasów oraz niską stabilnością termiczną i fotochemiczną!

Badania Doktoranta wykazały ponadto, że z reguły wyższe stężenia badanych leków występowały w wodach rzecznych w pobliżu wielkich miast: Wrocławia, Pragi, Gliwic (co wydaje się oczywiste) jak również wody te zawierały największą liczbę różnych leków (7 - 8 rodzajów), podczas gdy w wodach pozostałych wykrywano najczęściej od 2 do 5 leków.

W drugiej kolejności najczęściej obserwowanych (po naproksenie i diklofenaku) leków plasowały się pozostałości kwasu salicylowego, paracetamolu oraz ketoprofenu. Natomiast ibuprofenu, sterydów oraz β -blokerów (oprócz metoprololu) nie wykrywano w żadnych badanych wodach.

Jak wynika z przytoczonego powyżej przeglądu rozdziału pt. „Podsumowanie i wnioski” te ostatnie miały raczej charakter stwierdzeń, a wniosków sensu stricte wyciągnięto bardzo niewiele i z dużą ostrożnością. Z jednej strony jest to nadzwyczaj cenna zaleta młodego badacza, lecz z drugiej świadczyć może o zbytnej bojaźliwości i oporach przed podejmowaniem próby wyjaśnienia i interpretacji otrzymanych wyników. Daleka jestem od sugerowania wyciągania pochopnych wniosków lub zbytних uogólnień, lecz otrzymane wyniki są na tyle interesujące i frapujące zarazem, że kuszą do różnorodnych rozważań różnego typu wniosków np. Jaki wniosek można wysnuć z małego stężenia pozostałości leków w naszych wodach powierzchniowych, a jaki z faktu, że 2 związki o bardzo zbliżonym działaniu wstępują najczęściej, a 2 inne w największym stężeniu? Z drugiej zaś strony dlaczego stężenia kwasu salicylowego są mniejsze od stężeń kwasu acetylosalicylowego skoro ten pierwszy powstaje z drugiego, a ponadto z innych leków gdzie występuje samodzielnie?

Obawiam się jednakże, że pójście w tym kierunku rozważań może wykazać zbyt wiele ograniczeń każdego sposobu interpretacji takich wniosków (ponieważ należałoby uwzględnić w nich także popularność danego leku, średnie dawki dobowe związane z częstością zażywania, a także trwałość termiczną, chemiczną oraz fotochemiczną poszczególnych leków), lecz może samo w sobie być ciekawe i pouczające. Oczywiście są to uwagi przed wszystkim dyskusyjne i mam nadzieję na usłyszenie kontrargumentów Autora w tym zakresie.

W moim odczuciu największym walorem pracy jest jej rzetelność i to zarówno samego wykonania jak też opracowania, co przejawia się m. in. w takich szczegółach jak: 6-krotne powtarzanie każdej analizy, czy identyfikacja związku na chromatogramie czterema

metodami (tzn. wartość t_R , porównanie ze wzorcem, widmo UV oraz metoda dodawania wzorca), czy też bezdyskusyjne udowodnienie, że matryca wodna nie wykazuje interferencji ze związkami oznaczanymi. Sposób zaplanowania eksperymentów, opis procedur badawczych, przedstawienie wyników, walidacja każdej opracowanej metody oraz zakres dokumentacji budzą zaufanie i utwierdzają w przekonaniu, że Doktorant perfekcyjnie skonstruował warsztat badawczy i doskonale opanował tajniki analityki chemicznej. Znajduje to także pełne odzwierciedlenie w logicznym i zwięzłym ujęciu całej problematyki pracy, którą przedstawiono na 120 stronach w 7 rozdziałach: Wprowadzenie, Część literaturowa, Cel pracy, Część doświadczalna, Omówienie wyników, Podsumowanie i wnioski oraz Bibliografia. Wymienione rozdziały zostały poprzedzone wykazem skrótów używanych w pracy, w porządku alfabetycznym, co jest niezwykle pomocne podczas analizy treści kolejnych rozdziałów. Na uwagę zasługuje także bogate piśmiennictwo zgromadzone przez Autora w postaci 154 pozycji z których 99% to prace z ostatniego dziesięciolecia, w tym aż 10 prac z roku 2010. Wszystkie pozycje posiadają pełny tytuł i są profesjonalnymi, oryginalnymi pracami eksperymentalnymi bądź przeglądami naukowymi. Świadczy to także o dobrym przygotowaniu tematycznym Autora do prowadzenia pracy badawczej w zakresie reprezentowanym przez rozprawę oraz o znakomitej orientacji w badanym zagadnieniu.

Pod względem redakcyjnym przedstawiona praca doktorska jest opracowana bardzo starannie i z pieczołowitą korektą (zauważyłam tylko jeden błąd maszynowy!). Układ pracy jest przejrzysty i logiczny, a rozmieszczenie tabel, rycin i schematów prawidłowe, jak też odwoływanie się i cytowanie odpowiednich pozycji literaturowych.

Podczas lektury rozprawy zauważyłam pewne nieścisłości i uchybienia, z których najważniejsze to:

- nieprawidłowa pisownia nazw polskich badanych w pracy leków w przypadku kwasu acetylosalicylowego oraz karwedylolu i metamizolu sodowego
- brak zaznaczenia rodzaju soli używanej do badań w przypadku β -blokerów, sterydów oraz diklofenaku
- Autor nie podaje także czy stosowane w pracy „charakterystyczne długości fali świetlnej” to λ_{\max} czy też inne długości fali bądź inne maksima w przypadku występowania większej ich liczby
- praca moim zdaniem zyskałaby na zmianie kolejności omawiania wg rodzaju metod a nie ilości rozdzielanych związków

- Ryc. 5.2 i 5.3 byłyby bardziej czytelne gdyby zastosowano 2 rodzaje linii np.: ciągłą i kropkowaną lub ich odmienne kolory
- Ryc. 5.1 jest niezbyt zrozumiała na skutek braku szczegółowego opisu rzędnych oraz braku proporcji między wysokością pików a podanym stężeniem
- Tabele 5.12 i 5.13 po połączeniu byłyby bardziej przejrzyste i zrozumiałe a przy okazji oszczędzono by na objętości wykorzystując puste miejsca
- każda tabela zyskałaby na wprowadzeniu do podpisu rodzaju metody oraz ilości oznaczanych związków

Uwzględniając objętość rozprawy usterki te są oczywiście nieistotne dla jej ogólnej oceny, która nie budzi żadnych wątpliwości merytorycznych, co potwierdza ponadto fakt publikacji wyników w recenzowanych czasopismach krajowych i zagranicznych. Dołączona do pracy lista artykułów przygotowanych z udziałem Doktoranta obejmuje 4 pozycje z których 3 opublikowano w czasopismach o wysokiej renomie naukowej (*Pol. J. Environ. Stud., Water. Sci. Technol., Water Air Soil Pollut*), a których współczynnik IF leży w zakresie od 0,947 do 1,676 , natomiast jeden z artykułów przesłano do druku. Publikowanie prac w uznanych naukowych czasopismach specjalistycznych o profilu ekologicznym bądź chromatograficznym świadczy o ich odpowiednio wysokim poziomie, poprawności merytorycznej i zainteresowaniu badaniami zrealizowanymi z udziałem Doktoranta pod kierunkiem promotora, pani prof. Ireny Baranowskiej.

Ponadto dorobek naukowy mgr inż. Bartosza Kowalskiego uzupełniają komunikaty i wystąpienia zjazdowe w liczbie 8.

Reasumując - oceniana rozprawa doktorska oraz dorobek naukowy jej Autora świadczą o bardzo dobrym, ogólnym przygotowaniu do prowadzenia badań naukowych, a wyniki prac Doktoranta stanowią istotny wkład w rozwój badań nad udoskonaleniem metod rozdzielania, identyfikacji i oznaczania w wysokociśnieniowej chromatografii ciekłowej HPLC i UHPLC oraz pozwalają na wnikliwszą interpretację mechanizmów i zależności zachodzących podczas procesu chromatograficznego.

W świetle wyżej przedstawionej wysoko ocenionej pracy autorstwa mgr inż. Bartosza Kowalskiego pt. „Oznaczanie wybranych leków z różnych grup terapeutycznych w wodach powierzchniowych z zastosowaniem technik chromatograficznych” stwierdzam, że w pełni odpowiada ona warunkom formalnym i merytorycznym stawianym rozprawom doktorskim zawartych w ustawie z dn. 14 marca 2003 – *O stopniach naukowych i tytule naukowym* (Dziennik Ustaw RP nr 65 poz. 595 z dn. 16 kwietnia 2003).

W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej wniosek o dopuszczenie mgr inż. Bartosza Kowalskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wkład pracy wniesiony przez Doktoranta w trakcie konsekwentnej realizacji celu pracy, innowacyjny charakter podjętej tematyki oraz opublikowanie części wyników w czasopismach międzynarodowych o szerokim zasięgu i wysokiej renomie naukowej wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Poznań, dn. 30.05.2011

UNIwersytet MEDYCZNY
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
Katedra Chemii Farmaceutycznej

Prof. dr hab. Barbara Marciniak

Prof. zw. dr hab. Barbara Marciniak