

OCENA PRACY DOKTORSKIEJ

Pana mgr Marcina Gackowskiego
Zastosowanie metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz
wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej w analizie leków
o wybranej aktywności farmakologicznej
Promotor: dr hab. n. farm. inż. Marcin Koba, prof. UMK

Praca wykonana w Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu
Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy
Wydział Farmaceutyczny

Oceniana praca doktorska jest w postaci zbioru trzech tematycznie spójnych artykułów naukowych, opublikowanych w latach 2018-2019 w czasopiśmie o międzynarodowym zasięgu i współczynniku oddziaływania IF od ok. 0,5 do 1,1. We wszystkich publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorant jest pierwszym autorem. Dołączone w pracy doktorskiej oświadczenia Współautorów publikacji potwierdzają znaczącą rolę Pana Magistra (od 55 do 70%) w realizację tematyki badawczej pracy doktorskiej, zaproponowanej przez Promotora Pana dr hab. n. farm. inż. Marcina Koba, prof. UMK.

Dla każdej publikacji Doktorant przygotowywał przegląd literaturowy, przeprowadzał badania, przygotowywał i edytował tekst publikacyjny.

Z przekonaniem stwierdzam, że publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej są bardzo dobrze zaplanowane, a zakres badań, dyskusja oraz wnioski są w nich przedstawione na wysokim poziomie pod względem merytorycznym jak i edytorskim. Taka forma rozprawy doktorskiej jest zgodna Ustawą z dnia 14 marca 2003 stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (D.U.2017, poz. 1789).

Układ pracy

Przedstawiona do oceny praca doktorska Pana mgr Marcina Gackowskiego napisana jest bardzo starannie i zawiera 34 strony komentarza do cyklu publikacyjnego. Rozdziały-komentarze są zwięzłe i składają się z: wstępu, części teoretycznej, celu pracy, części eksperymentalnej, dyskusji wyników i wniosków, streszczenia, summary, literatury, kopii publikacji wchodzących w skład cyklu, oświadczeń o procentowym udziale pracy współautorów publikacji.

W podsumowaniu mogę stwierdzić, że struktura pracy doktorskiej nie budzi moich zastrzeżeń, gdyż w ocenianej broszurze – komentarzu do cyklu publikacji są wszystkie niezbędne rozdziały i dla Potencjalnego Czytelnika są logiczne.

Wstęp i część teoretyczna pracy

Autor przedstawił wiadomości w tych rozdziałach w sposób zwięzły. Uwypuklił ważność metod analitycznych w kontroli jakości produktów leczniczych. W dalszych zdaniach *Części teoretycznej* Autor przybliżył temat zastosowania spektrofotometrii pochodnych widm oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej we współczesnej analizie leków. Doktorant słusznie zauważył, że metody te nie są stosowane tak często, jak na przykład wysokosprawna chromatografia cieczowa, czy metody klasyczne, ale z uwagi, że są one precyzyjne, dokładne, a ponadto szybkie i tanie mogą być wykorzystane do rutynowej kontroli jakości produktów farmaceutycznych. Rozdział ten jest przedstawiony na pięciu stronach i jest przede wszystkim komentarzem do przeglądowej publikacji, opublikowanej w 2019 w międzynarodowym czasopiśmie *Current Pharmaceutical Analysis*. W tym miejscu zaznaczę i podkreślę, że publikacja ta powstała w wyniku przeglądu 156 pozycji literaturowych z lat 2010-2018, co świadczy o doskonałym teoretycznym przygotowaniu i wysokim zaangażowaniu Doktoranta w proces realizacji pracy teoretycznej i myślę, że zredagowanie tej publikacji umożliwiło też Doktorantowi dobre przygotowanie do pracy eksperymentalnej.

Cel pracy

Głównym tematem badawczym – celem niniejszej pracy było ocena możliwości wykorzystania metod: spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną w analizie ilościowej leków: lormetazepam (lek nasenny), trimetazydyna (lek cytoprotekcyjny), amrinon i milrinon (leki inotropowododatnie i wazodilacyjne). Warto podkreślić, że w/w leki są nie tylko o zróżnicowanej aktywności farmakologicznej, ale także odmiennej budowie chemicznej, czyli każda oznaczana substancja

lecnicza wymagała odmiennych parametrów rozdziału. Podjęcie przez Doktoranta wyżej wymienionego celu badawczego uważam za uzasadnione. Wiadomym jest, że jednym z elementów, zapewniającym właściwe wykonanie analizy oznaczania leku w postaci farmaceutycznej jest dobór odpowiedniej i wiarygodnej metody analitycznej, spełniającej wszystkie kryteria przydatności, związane z jej przeznaczeniem. Stąd metoda, wykorzystywana do oznaczania leku musi charakteryzować się: wysoką selektywnością w stosunku do oznaczanych substancji, niskim limitem oznaczalności – do wykrywania zanieczyszczeń i produktów rozkładu, których zawartość w próbce w stosunku do substancji leczniczej może wynosić zaledwie 1 – 4%, z dokładnością i precyzją. Dużą popularność w dziedzinie analizy leków zyskały sobie metody chromatograficzne, wysokosprawna chromatografia: cieczowa (HPLC) oraz cienkowarstwowa (HPTLC). Natomiast niezaprzeczalną zaletą metody spektrofotometrycznej UV jest prostota przeprowadzenia analizy w bardzo krótkim czasie, gdyż proces przygotowania próbki oraz wykonania pomiaru obejmuje jedynie rozpuszczenie substancji badanej oraz jej rozcieńczenie do pożądanych stężeń i odczytanie wartości absorbancji przy analitycznej długości fali (λ_{\max}). Dużą wagę przy doborze tejże metody analitycznej w analizie leków przywiązuje się także do takich jej cech jak: możliwość dokonania oznaczenia bez konieczności posiadania substancji porównawczej, dzięki znajomości wartości absorpcji właściwej lub molowego współczynnika absorpcji. Ponadto zastosowanie techniki pochodnych widm pozwala rozdzielić nakładające się pasma widma klasycznego oraz precyzyjnie wyznaczyć λ_{\max} .

Cel badawczy został realizowany przez Doktoranta w sześciu etapach, m.in.: dokonano wyboru: odpowiedniego rozpuszczalnika i wyznaczono maksimum absorpcji indywidualnie dla metody spektrofotometrycznej oraz dla pomiaru densytometrycznego (skanowanie płytki chromatograficznej), fazy stacjonarnej i ruchomej dla chromatografii cienkowarstwowej, ustalono optymalny czas ekstrakcji związku z mieszaniny modelowej i/lub preparatu farmaceutycznego, przygotowano roztwory wzorcowe, mieszaniny modelowe na trzech poziomach zawartości substancji czynnej w odniesieniu do badanej postaci leku do oceny dokładności i precyzji metod, obliczono odzysk, granicę wykrywalności i oznaczalności, określono specyficzność metod; wyznaczono współczynnik zmienności, porównano precyzję dla dwóch metod indywidualnie wyznaczono współczynnik Horwitz'a (precyzja akceptowalna dla walidacji w ramach pojedynczego laboratorium dla każdego z analizowanych związków (lormetazepam, trimetazydyna, amrinon, milrinon).

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że założony w sześciu etapach cel badawczy przez Doktoranta oraz Promotora pracy dr hab. inż. Marcina Koby, prof. UMK wpisuje się w nurt

analizy farmaceutycznej i jest bardzo ważny z punktu widzenia zarówno naukowego jak i aplikacyjnego. Dodam, że cel pracy doktorskiej Pan Magister realizował bardzo rzetelnie, a w otrzymanie tak licznych wyników analiz na pewno włożył sporo pracy.

Ocena metodologii badań i wnioski

Poprawność merytoryczna realizowanych eksperymentów w ramach rozprawy doktorskiej, została zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, dlatego też w niniejszej ocenie dokonam analizy innych aspektów.

Przedstawione w cyklu prace są bardzo tematycznie spójne, każda praca opisuje przydatność metody spektrofotometrycznej i chromatograficznej do analizy ilościowej wybranych przez Doktoranta leków.

Opracowując metodę spektrofotometryczną Pan Magister rozpoczął od wyznaczania widma podstawowego oraz kolejnych pochodnych widm, stosując algorytm obliczeniowy Savitzky-Golay (order=3, delta lambda = 6 nm) oraz techniki pik-zero (P-0), zero-pik (0-P) oraz pik-pik (P-P). Kolejnym krokiem było wyznaczenie krzywych kalibracyjnych. Na moją uwagę i uznanie zasługuje ich liczebność, którą pozwolę sobie wymienić – 10 krzywych dla lormetazepamu, 20 krzywych dla trimetazydyny oraz 36 krzywych i 22 dla amrinonu i milrinonu. Spoglądając na liczne wyniki przedstawiane w publikacjach dotyczące walidacji metody spektrofotometrycznej sądzę, że Pan Magister bardzo dobrze porusza się w obszarze matematyki i statystyki. Ponadto, Doktorant uzyskał akceptowalne wartości odzysku dla mieszanin modelowych oraz preparatów farmaceutycznych stosując metodę spektrofotometryczną. W tym miejscu podkreślę, mimo iż tych wyników jest bardzo, bardzo wiele, w pracach nie ma chaosu, gdyż Doktorant pogrupował je i zestawiał w odpowiednich tabelach, zarówno w publikacjach jak i w komentarzu, co ułatwiło ich analizę.

Oprócz wyników oznaczania wybranych leków metodą spektrofotometryczną, w publikacjach składających się na cykl rozprawy doktorskiej znajdujemy szczegółowe opisy procedur niezbędnych przy opracowywaniu metody wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej z detekcją densytometryczną dla lormetazepam (P2), trimetazydyna (P3), amrinon (P4), milrinonu (P4), m.in. sposobu aplikacji, doboru fazy ruchomej, rozwijania chromatogramów oraz wyznaczania analitycznej długości fali na podstawie densytometrycznego pomiaru absorbancji. Wyniki zostały czytelnie przedstawione w tabelach, co ułatwiło znacznie ich analizowanie, a wszystkie oznaczane parametry walidacyjne takie jak: liniowość, precyzja, dokładność, oznaczalność, wykrywalność, odzysk były akceptowalne. Ponadto, Doktorant wykazał, że obie

metody, a więc spektrofotometryczna i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną są specyficzne.

Do największych osiągnięć Doktoranta zaliczam, opracowanie dwóch metod analitycznych a mianowicie spektrofotometryczną i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną do oznaczania lormetazepamu, trimetazydyny, amrinonu i milrinonu w preparatach farmaceutycznych. Przedstawione w publikacjach i w komentarzu wyniki, jednoznacznie wskazują, że wyznaczone ich parametry walidacyjne są akceptowalne. Ponadto, Doktorant przeprowadził analizę statystyczną (t-test, F-test) nowo opracowanych metod i nie zauważył różnic statystycznych istotnych przy oznaczaniu metodą spektrofotometryczną i wysokosprawną chromatografią cienkowarstwową z detekcją densytometryczną tej samej substancji leczniczej.

Moim zdaniem, w/w wnioski odzwierciedlają najistotniejsze elementy naukowe i poznawcze pracy badawczej Doktoranta. Jestem przekonana, że Autor w pełni zrealizował zaplanowany program badań, a uzyskane przez Niego wyniki zawierają elementy nowości naukowej i mają duży potencjał aplikacyjności, gdyż dobór właściwej metody pomiarowej, w analizie leków gwarantuje bezpieczeństwo.

Na zakończenie mojej oceny jeszcze raz podkreślę, że Doktorant w załączonym zbiorze publikacji potwierdził swoją znajomość zagadnień analitycznych, wymagało to od niego wiedzy nie tylko z zakresu analizy, ale także wiedzy matematyczno-statystycznej.

Reasumując, nie mam żadnych wątpliwości, że rozprawa doktorska Pana mgr Marcina Gackowskiego, pt. „Zastosowanie metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej w analizie leków o wybranej aktywności farmakologicznej” jest pracą nowatorską, wartościową i wnosi elementy aplikacyjne w analizie leków.

Wnioskuje i proszę Wysoką Radę Wydziału Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Wydział Farmaceutyczny o kontynuowanie dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
Beata Stanis
Dr hab. n. farm. Beata Stanis prof. UM