



Dr hab. n. farm. Ilona Olędzka

Gdańsk, 9.05.2019

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Recenzja rozprawy doktorskiej Pana mgr. Marcina Gackowskiego pod tytułem
„Zastosowanie metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii
cienkowarstwowej w analizie leków o wybranej aktywności farmakologicznej”.

Praca wykonana w Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy,

Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu,

pod kierunkiem promotora dr. hab. n. farm. inż. Marcina Koby, prof. UMK

Poszukiwanie wiarygodnych i bardziej ekonomicznych metod oznaczania leków od wielu lat jest przedmiotem badań prowadzonych w wielu ośrodkach naukowych. Wynika to ze zwiększającego się asortymentu leków, jak również poszerzenia wymagań dotyczących oceny produktów leczniczych, które sprawiają, iż ostatnie dziesięciolecia charakteryzuje dynamiczny rozwój nowoczesnych i zautomatyzowanych metod separacyjnych. Metody te powinny być efektywne zarówno pod względem czasu, jak i kosztów ich wykonania aby sprostać rosnącym wymaganiom stawianym analizie farmaceutycznej zarówno na etapie wprowadzania nowego produktu leczniczego na rynek, określenia jego terminu ważności, oraz wprowadzania nowych serii produktu w celu potwierdzenia ich wysokiej jakości.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska dobrze wpisuje się we wspomniane powyżej zagadnienia współczesnej farmacji. Dotyczy zastosowania metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej (HPTLC) z detekcją densytometryczną do identyfikacji i oznaczenia ilościowego wybranych substancji leczniczych w postaciach farmaceutycznych. Technika HPTLC jest często stosowana w analizie farmaceutycznej produktów leczniczych, suplementów diety, materiałów roślinnych czy w badaniach mikrobiologicznych. Z kolei spektrofotometria pochodnych widma znajduje zastosowanie w analizie leków, a zwłaszcza w ocenie stabilności substancji aktywnych, w oznaczaniu produktów rozkładu, a także w analizie preparatów złożonych. Autor przedłożonej do recenzji dysertacji zastosował wspomniane metody podczas analizy ilościowej leków o zróżnicowanych właściwościach



fizykochemicznych i różnorodnej aktywności farmakologicznej. Badaniami objęte zostały: *lormetazepam* – lek o działaniu nasennym, uspokajającym i przeciwłękowym; *trimetazydyna* – lek stosowany w chorobie niedokrwiennej serca o działaniu kardioprotekcyjnym oraz *amrinon* i *milrinon* – leki inotropowododatnie i wazodilacyjne.

Cel badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej został jasno sprecyzowany i dotyczył oceny możliwości zastosowania metod opartych na spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną w analizie ilościowej wspomnianych substancji leczniczych. Autor określił także cele szczegółowe, które obejmowały: (i) analizę możliwości wykorzystania spektrofotometrii pochodnych widma i HPTLC w rutynowej kontroli jakości leków oraz roli tych technik we współczesnej farmacji, (ii) możliwości wykorzystania spektrofotometrii pochodnych widma i wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną do opracowania metod analizy ilościowej *lormetazepamu*, *trimetazydyny*, *amrinonu* i *milrinonu* w preparatach farmaceutycznych oraz w mieszaninach modelowych, (iii) porównania dokładności i precyzji użytych metod indywidualnie dla każdej z oznaczanych substancji czynnych i w konsekwencji wyboru optymalnej metody do rutynowego zastosowania w oznaczaniu analizowanych związków.

Najczęściej rekomendowanymi metodami do oceny stabilności substancji aktywnych oraz jakości preparatów farmaceutycznych są techniki chromatograficzne: chromatografia cieczowa (LC) i chromatografia gazowa (GC). Jednakże, zaproponowane przez Autora techniki stanowią dla nich interesującą alternatywę, zarówno pod względem technologicznym, jak i ekonomicznym. Ponadto, opracowanie szybkich, czułych i stosunkowo tanich w eksploatacji metod pozwalających ocenić trwałość preparatów leczniczych wpisuje się w tendencje światowe ze względu na wymiar ekonomiczny, ale przede wszystkim medyczny ze względu na bezpieczeństwo stosowania oraz poprawę efektywności terapii farmakologicznej różnorodnych zaburzeń zdrowotnych. Biorąc powyższe pod uwagę uważam, że podjęcie tematu zaproponowanego przez Doktoranta było aktualne, potrzebne i w pełni zasadne.

Mgr Marcin Gackowski przedstawił rozprawę doktorską w formie cyklu stanowiącego kompilację czterech artykułów opublikowanych w latach 2018-2019 w czasopiśmie z listy filadelfijskiej: *Current Pharmaceutical Analysis*, *Journal of Planar Chromatography – modern TLC* oraz *Acta Pharmaceutica*. Łączny współczynnik oddziaływania Impact Factor prac wynosi **3,248** a punktacja MNiSW **65**. Praca obejmuje 108 stron i zawiera spis treści, spis tabel, wykaz stosowanych skrótów, wstęp, część teoretyczną, cel pracy oraz część eksperymentalną, w której opisane zostały wyniki otrzymane w trakcie realizacji prac badawczych, dyskusję wyników oraz wnioski. Ponadto,



zawiera także streszczenie w języku polskim i angielskim, spis literatury, kopie publikacji wchodzących w skład cyklu oraz oświadczenia o procentowym udziale w poszczególnych publikacjach wszystkich współautorów opublikowanych prac naukowych. Układ pracy jest przejrzysty i nie budzi zastrzeżeń.

Podstawowym celem pracy była ocena możliwości zastosowania metod opartych o spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowsarstwowej z detekcją densytometryczną w rutynowej kontroli jakości leków, a jego zadania badawcze zostały realizowane w kilku etapach. Autor rozpoczął od obszernego przeglądu literatury opublikowanej w latach 2010-2018, który jednoznacznie potwierdził zasadność zastosowania dwóch wspomnianych już technik badawczych w oznaczaniu wielu substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych. Co więcej, Autor zyskał literaturowe potwierdzenie, że metody będące przedmiotem pracy, po odpowiedniej optymalizacji mogą być konkurencyjne do drogich i czasochłonnych technik separacyjnych rekomendowanych przez Farmakopeę Polską XI, takich jak HPLC, GC czy elektroforeza kapilarna (CE).

Następnie, Autor starannie zaplanował kolejne etapy eksperymentu badań, które obejmowały opracowanie metod ilościowego oznaczania wybranych substancji aktywnych poprzez dobór warunków analizy dla każdego z nich indywidualnie. W tym etapie, Autor wybrał odpowiedni rozpuszczalnik, ustalił maksimum absorpcji zarówno dla metody spektrofotometrycznej jak i pomiaru densytometrycznego; w przypadku chromatografii cienkowsarstwowej dobrał dla każdego analitu skład fazy stacjonarnej oraz fazy ruchomej; wreszcie ustalił optymalny czas ekstrakcji związku z mieszaniny modelowej. Następnie przygotował próbki mieszanin modelowych na trzech poziomach zawartości substancji czynnej oraz próbki ze sproszkowanych tabletek. Kolejnym krokiem było wykonanie oznaczeń techniką DS, w której zarejestrowane zostały widma podstawowe spektrofotometrem dwuwiązkowym oraz obliczone kolejne pochodne widma. W przypadku HPTLC wykonano analizy chromatograficzne, a następnie przeprowadzono densytometryczne pomiary absorbancji oraz wykonano dokumentację zarejestrowanych widm oraz densytogramów.

Kolejnym etapem badań przeprowadzonych przez Mgr Marcina Gackowkiego była walidacja opracowanych metod analitycznych ponieważ wiarygodność metod analitycznych musi być potwierdzona. Z tego względu podlegają walidacji zgodnie z wytycznymi ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*), w ramach których określone zostały takie parametry jak: odzysk, granica wykrywalności i oznaczalności metody, specyficzność, współczynnik zmienności, współczynnik Horwitz'a. Porównano precyzję dla dwóch metod indywidualnie dla każdej substancji aktywnej z wykorzystaniem testu *F-Snedecor'a*



oraz dokładności z wykorzystaniem testu *t-Studenta*. Ze względu na fakt, że walidacja metody była jednym z istotnych etapów badań wyznaczonych przez Doktoranta, w części teoretycznej rozprawy przydałby się krótki opis sposobu wyznaczania wspomnianych parametrów oraz podanie kryteriów ich akceptacji. Lektura rozdziału *Dyskusja wyników i wnioski* pozostawia czytelnikowi pewien niedosyt. Brak jest informacji na temat metod ilościowych, które są obecnie najczęściej stosowane w analizie farmaceutycznej badanych przez Doktoranta leków. Tym samym nie jest możliwe określenie, jakie są ich słabe i mocne strony w porównaniu do metod już opublikowanych w literaturze. Autor pisze: „zaprezentowane w niniejszej rozprawie metody cechuje akceptowalna dokładność, precyzja...” i jest tu odnośnik do prac P2-P4. Wprawdzie lektura publikacji wchodzących w skład cyklu wyjaśnia te kwestie w szerszym zakresie, ale podsumowanie tych zagadnień w dyskusji jest zasadne i powinno być przeprowadzone. Tym bardziej, że Dyskusja bardzo krótko scala wątki podjęte w poszczególnych pracach wchodzących w skład cyklu i została przeprowadzona na podstawie niewielkiego zestawu literatury (20 pozycji). Należy jednak zwrócić uwagę, że są to dodatkowe pozycje literaturowe poza cytowanymi w poszczególnych pracach (P1-P4), co wskazuje, że Doktorant zna najnowsze publikacje z zakresu analizy farmaceutycznej.

Otrzymane wyniki swoich eksperymentów Doktorant opublikował w czterech publikacjach będących przedmiotem niniejszej rozprawy. Praca (P1) ma charakter poglądowy. W kolejnych pracach Doktorant zastosował obie techniki do analizy ilościowej dla każdej analizowanej substancji leczniczej: *lormetazepam* (P2), *trimetazydyna* (P3) oraz *amrinon* i *milrinon* (P4) potwierdzając w ten sposób ich użyteczność w praktyce farmaceutycznej. Doktorant brał udział we wszystkich istotnych etapach przeprowadzanych eksperymentów. Na uwagę zasługuje też fakt, że we wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem i jednocześnie pełni rolę autora korespondencyjnego, co dodatkowo potwierdza jego wiodący wkład w powstawanie publikacji. Zostało to także potwierdzone w oświadczeniach o udziale procentowym wszystkich współautorów publikacji. Udział procentowy Doktoranta w tworzeniu prac wchodzących w skład cyklu jest znaczący i wynosi od 55 do 70%. Świadczy to o dużej samodzielności badawczej Doktoranta i potwierdza jego wiedzę w obrębie poruszanej tematyki badawczej.

Do oryginalnych osiągnięć Autora w przedstawionej pracy doktorskiej zaliczam:

- Opracowanie interesujących metod analizy ilościowej *lormetazepamu*, *trimetazydyny*, *amrinonu* i *milrinonu* w postaci farmaceutycznej opartych na technikach spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytryczną



- Poszerzenie wiedzy na temat możliwości efektywnego zastosowania technik HPTLC i spektrofotometrii pochodnych widma w analizie ilościowej wspomnianych substancji leczniczych jako alternatywnych dla metod chromatograficznych sposobów oznaczania zawartości substancji aktywnych w mieszaninach modelowych i w gotowych produktach leczniczych.

Z obowiązku recenzenta muszę zwrócić uwagę na niedociągnięcia językowe i edycyjne:

Na stronie 10 pojawił się drobny błąd stylistyczny. Jest zapis: „*W tym świetle ciągly rozwój metod analitycznych oraz optymalizacja już istniejących jest nieodzowny*” raczej powinno być „...*sq nieodzowne*”.

Na stronie 16 Autor przedstawił w postaci schematu nr 1, kolejne etapy opracowywania metody analizy ilościowej. Pierwszy etap Doktorant zatytułował „*Analiza potencjalnych zastosowań aplikacyjnych*” - słowo *aplikacyjne* pochodzi od angielskiego *application* i właśnie tu oznacza *zastosowanie*, zatem aby uniknąć powtarzania, poprawniej było by nazwać ten etap „*Analiza potencjalnych zastosowań*”. Na tym samym schemacie pojawia się jeden z kolejnych etapów zatytułowany „*Kalibracja, Walidacja*” – wystarczy „*Walidacja*” gdyż wykonanie kalibracji metody jest jednym z etapów walidacji. Ostatni etap „*Rutynowa analiza*” może lepiej było by zastąpić tytułem „*Analiza w opracowanych warunkach*”.

W tabeli 1 strona 21 – równanie krzywej kalibracyjnej – dla każdej substancji podano ogólny wzór $y=ax+b$, lepiej było by umieścić tu równanie zawierające wartości współczynnika kierunkowego a i wyrazu wolnego b .

Powyższe uwagi nie wpływają jednak na całościową ocenę pracy doktorskiej.

Wniosek końcowy

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona do oceny praca doktorska mgr Marcina Gackowskiego pt. *Zastosowanie metod spektrofotometrii pochodnych widma oraz wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej w analizie leków o wybranej aktywności farmakologicznej*, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, zawarte w ustawie o Tytule i stopniach Naukowych, a dorobek naukowy Kandydata uzasadnia nadanie Mu stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych. Wnoszę więc do Wysokiej Rady Wydziału Farmaceutycznego Collegium



Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej
ul. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk
tel./fax 58 349 16 35
Kierownik: prof. dr hab. **Tomasz Bączek**
e-mail: tbaczek@gumed.edu.pl

Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, wniosek o dopuszczenie Pana mgr Marcina Gackowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Uzasadnienie

Oceniana praca wnosi do analizy farmaceutycznej nowe informacje o zastosowaniu technik wysokosprawnej chromatografii cienkowarstwowej oraz spektrofotometrii pochodnych widma w rutynowej kontroli zawartości wybranych substancji czynnych w postaci farmaceutycznej. Praca posiada zatem aspekt praktyczny. Otrzymane wyniki badań zostały opublikowane w formie czterech prac oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych, posiadających *impact factor*. We wszystkich pracach Doktorant jest pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym. Sumaryczny IF publikacji będących podstawą dysertacji wynosi 3,248 a punktacja MNiSW 65.

ADIUNKT
KATEDRY I ZAKŁADU
CHEMII FARMACEUTYCZNEJ
dr hab. Iłona Oędzka