

Prof. dr hab. inż. Jerzy Błażejowski

Gdańsk, dnia 17 października 2018 roku

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr farm. Edyty Leyk zatytułowanej *Ocena użyteczności różnicowej kalorymetrii skaningowej w analizie wybranych substancji czynnych w produktach leczniczych* przedstawionej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego celem uzyskania stopnia naukowe doktora nauk farmaceutycznych

W rozprawie doktorskiej przedstawione są wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem metody różnicowej kalorymetrii skaningowej (DSC) oraz wybranych metod spektroskopowych (IR, Ramana) i fizykochemicznych (termoskopii, pomiarów rozpuszczalności i mieszalności) w kontekście możliwości wykorzystania pierwszej z metod do: (i) identyfikacji substancji czynnych lub pomocniczych stosowanych w przemyśle farmaceutycznym, (ii) potwierdzania obecności składnika lub składników w produktach leczniczych oraz (iii) ilościowego określania substancji czynnej lub substancji pomocniczych w produktach farmaceutycznych. Badaniami objęte były zarówno produkty handlowe zawierające wyselekcjonowane substancje czynne (paracetamol, kwas acetylosalicylowy, kofeinę, teofilinę), jak i mieszaniny ostatnich z dodatkami obojętnymi (tlenkiem glinu) oraz pełniącymi rolę substancji pomocniczych do produkcji leków (hypromelozą, laktozą, sacharozą, skrobią, mieszaninami hypromelozy lub laktozy ze stearynianem magnezu). Wyniki ilościowe poddano obróbce statystyczne, a opracowane procedury – walidacji. Podjęto próbę oceny, jak dalece technika DSC może być przydatna w analityce

farmaceutycznej biorąc pod uwagę, że: pomiary tą metodą są w miarę szybkie i tanie a jednocześnie zadowalająco dokładne i precyzyjne, próbki nie wymagają specjalnej obróbki, a także nie ma potrzeby stosowania do analiz rozpuszczalników lub innych chemikaliów. Tematyka rozprawy jest interesująca poznawczo i aplikacyjnie, gdyż badania zostały podjęte z myślą o znalezieniu alternatywnej – do rekomendowanych w farmakopeach – metody analitycznej oceny jakości produktów leczniczych i ich prekursorów oraz kontroli procesów ich wytwarzania, z zachowaniem współcześnie obowiązujących standardów oraz zasad „zielonej chemii”. Tematyka rozprawy doktorskiej wkomponowuje się w istotny nurt badań współczesnej analityki farmaceutycznej a jej wybór należy uznać za trafny i wychodzący naprzeciw oczekiwaniom kierowanym pod adresem środowisk naukowych.

Rozprawa doktorska – przygotowana pod okiem doświadczonego naukowca, prof. dr hab. Marka Wesołowskiego (promotora) – bazuje na wynikach oryginalnych badań, które były we fragmentach prezentowane na konferencjach naukowych (nie przywołanych w *Bibliografii*). Tekst rozprawy podzielony został na 6 rozdziałów zatytułowanych: *Wstęp*, *Część teoretyczna*, *Cel pracy*, *Część eksperymentalna*, *Wyniki doświadczeń i dyskusja* oraz *Wnioski*. We *Wstępie* zaprezentowane są instytucje sprawujące pieczę nad jakością leków oraz scharakteryzowane zostały parametry produktów leczniczych, które determinują ich: cechy, jakość, stosowalność i przydatność do użycia. W *Części teoretycznej* opisano skrótowo metody fizykochemiczne służące do określania tożsamości, postaci, czystości, trwałości i jakości substancji stosowanych do wytwarzania farmaceutyków i ich prekursorów, to jest różnicową kalorymetrię skaningową i spektroskopię w podczerwieni. Zidentyfikowano też zagadnienia wiążące się z trwałością i jakością produktów leczniczych w relacji do wzajemnych interakcji między ich składnikami, możliwości tworzenia kokryształów, różnych form finalnych leków oraz oceny ich trwałości i przydatności do użycia. W rozdziale *Cel pracy* zarysowane zostały przesłanki podjęcia badań i oczekiwania co do ich efektów w kontekście współczesnych standardów farmakopealnych i analitycznych. W *Części eksperymentalnej* scharakteryzowano materiały i procedury przygotowania próbek, a także metody stosowane w badaniach i obróbce matematycznej wyników. Następnie sukcesywnie zaprezentowane zostały wyniki badań uzyskane:

metodami różnicowej kalorymetrii skaningowej oraz spektroskopii IR i Ramana, metodą termomikroskopową oraz poprzez określenie rozpuszczalności i mieszalności. Dokonano też podsumowania wyników uzyskanych daną metodą lub grupą metod w kontekście prognozowanych oczekiwań. Najistotniejsze efekty badań zostały uwypuklone w rozdziale *Wnioski*. Na początku rozprawy zamieszczony został *Wykaz używanych skrótów*. Rozprawę kończy *Bibliografia* obejmująca 184 pozycje – dobrze korelujące z problematyką rozprawy. Streszczenie w języku polskim i angielskim zarysowuje motywy podjęcia badań i główne ich efekty oraz ukazuje perspektywy ewentualnych zastosowań analitycznych i technologicznych metody DSC. Powyższa charakterystyka wskazuje, że rozprawa doktorska została przygotowana zgodnie z obowiązującymi przepisami i ukształtowaną tradycją akademicką.

Istotne wnioski płynące z badań przeprowadzonych w związku z rozprawą doktorską przedstawione są poniżej.

- Zostało potwierdzone, że metoda DSC może być stosowana do identyfikacji substancji czynnych lub pomocniczych oraz weryfikacji ich tożsamości na podstawie temperatur i entalpii topnienia lub temperatur innych przemian fazowych (polimorficznych, szklistych), gdy nie pojawiają się interakcje między składnikami.
- Analiza wyników uwydatnia, że istnieją liniowe zależności między zmierzoną – metodą DSC – entalpią topnienia substancji czynnych a ich zawartością w mieszaninie, w obszarze wysokich koncentracji, nie ekstrapolujące się do początku układu współrzędnych.
- Przyczyną odstępstw zależności: ciepło topnienia – zawartość substancji w mieszaninie od proporcjonalności jest utrata przez niektóre substancje czynne krystaliczności – spowodowana kontaktem z substancją pomocniczą (efekt głównie widoczny, gdy była nią bezpostaciowa hypromeloza) – oraz wzajemne mieszanie składników.
- Dodatek wzorca nie usuwa wpływu substancji pomocniczych na przebieg zależności: ciepło topnienia substancji czynnej – jej zawartość w mieszaninie, co czyni te zależności, jak i metodę DSC, mało przydatnymi do celów analitycznych.

- Nie pojawiają się istotne interakcje między substancjami czynnymi a pomocniczymi w analizowanych układach.
- Badane substancje czynne są względnie trwałe termicznie; w wyższych temperaturach sublimują one lub częściowo rozkładają się (kwas acetylosalicylowy ulega deacetylacji).

Liczba danych i ilości informacji zgromadzonych w rozprawie jest duża, co świadczy o znacznym zaangażowaniu doktorantki w realizację badań. Wyniki i ich analiza są w całości przedstawione w rozprawie, a tylko wybrane zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych. Rozprawa napisana jest poprawnie i jasno. Drobnych niedopatrzeń nie wyszczególniam. Chciałbym natomiast poruszyć kwestie wymagające wyjaśnień. Podaję je poniżej licząc na komentarz w trakcie obrony rozprawy.

- Analizując tekst na stronie 10 (wiersze 1–8 od góry) niejasne wydają się relacje między energią, entalpią i ciepłem. Wszystkie trzy wielkości są przywołane w tekście, co nie wydaje się uzasadnione.
- Czy na pewno rysunek 4 (strona 25) przedstawia „modelowy diagram fazowy dla układu dwuskładnikowego”?
- Na stronach 90 (wiersze 3–5 od góry) oraz 124 (wiersze 11–13 od góry) stwierdza się, że gdy „różnica energii swobodnej”.... „jest równa zero”, to układ jest w stanie równowagi, a więc jest „energetycznie” trwały – czy na pewno energetycznie ?
- W końcu strony 11 i początku 12 niefortunne jest zdanie „Następnie odbywa się powrót cząsteczki do stanu energetycznego niższego z równoczesną emisją nadwyżki energii” w kontekście następującego po nim tekstu. O jaką „nadwyżkę energii” chodzi i jak się ona ma do zjawiska rozpraszania Ramana i Reileigh’a?
- Niezrozumiałe jest drugie zdanie w tekście pod rysunkiem 4 (strona 25): „Wykorzystuje się w tym celu funkcję energii swobodnej Gibbsa, opierającej się na energii wewnętrznej układu”.

Jakie są relacje między energią swobodną Gibbsa a energią wewnętrzną i jak one mają się do rozważanego problemu?

- Czy metoda DSC wykorzystywana jest do określania efektów cieplnych wyłączenie procesów fizycznych (przemian fazowych)? Takie wrażenia odnosi się po lekturze tekstu na stronie 9 (wiersze 16–19 od góry).
- Analizując tekst na stronie 11 (wiersze 2–5 od góry) można by sądzić, że promieniowanie IR oddziaływując z cząsteczką powoduje zmiany energii wibracyjnej tylko wiązań chemicznych. Czy tak w rzeczywistości jest?
- Napisy na rysunku 6 (str. 37) zostały umieszczone niefortunnie – niektóre powinny być odwrócone, a inne przesunięte.
- Wielokrotnie w tekście użyte jest określenie „krzywa kalibracji”, chociaż zależności analizowane są liniowe. A może lepiej używać określeń: „linia kalibracji” lub „równanie regresji”?
- Ogólnie przyjętą zasadą jest podawanie wartości różnych wielkości z dokładnością do 3 cyfr znaczących. Ta zasada nie zawsze przestrzegana jest w prezentacjach wyników. Na przykład, w tabeli 9 (str. 46) temperatura podana jest z dokładnością do 5 cyfr znaczących (ostatnia kolumna). Podobnie jest w innych tabelach i równaniach regresji. Czy można oczekiwać wyjaśnienia tej kwestii?

Podsumowując, rozprawa jest wartościowym źródłem wiedzy na temat możliwości zastosowań metody różnicowej kalorymetrii skaningowej w analityce farmaceutycznej. Na szczególne uznanie zasługuje wykonanie przez doktorantkę dużej liczby precyzyjnych pomiarów oraz opracowanie ich zgodnie z obowiązującymi standardami analitycznymi i farmakopealnymi. Za ciekawe uznać należy próby wyjaśnienia przyczyn braku proporcjonalności między wartościami ciepła topnienia badanych substancji czynnych a ich zawartością w mieszaninach z hypromelozą. Uzyskane przez doktorantkę unikatowe diagramy fazowe dla układów krystaliczno-amorficznych wyjaśniają

przyczyny niepowodzeń w wykorzystaniu metody DSC do celów oznaczeń ilościowych i niosą technologicznie przydatne informacje. Rozprawa doktorska uwypatnia, że doktorantka dokonała trafnego wyboru tematyki badawczej, osiągnęła założone cele i przedstawiła efekty badań zgodnie z obowiązującymi standardami akademickimi. Można zatem uznać, że doktorantka opanowała tajniki warsztatu naukowego i jest przygotowana do samodzielnego planowania i realizowania badań. Potwierdzają to jej osiągnięcia publikacyjne, na które składa się współautorstwo 2 publikacji oraz 14 prezentacji na międzynarodowych (9) i krajowych (5) konferencjach naukowych.

Biorąc powyższe przesłanki pod uwagę uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska spełnia ustawowe (w świetle ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz.U. Nr 65 poz. 595, z późn. zm.), a także wydanych a jej podstawie rozporządzeń) oraz zwyczajowe kryteria stawiane rozprawom doktorskim.

Wnoszę o dopuszczenie rozprawy do publicznej obrony.

