



UNIWERSYTET GDAŃSKI



WYDZIAŁ CHEMII - Zakład Chemii Cukrów



CHEMIA UG

Dr hab. Beata Liberek, prof. UG

### Recenzja

#### rozprawy doktorskiej mgr Magdy Caban

#### pt. "Porównanie oraz opracowanie nowych metod oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej"

Obecność aktywnych związków farmaceutycznych w środowisku jest faktem. Faktem jest też ich negatywny wpływ na środowisko, ściśle skorelowany ze stężeniem danego farmaceutyku. Kompleksowa analiza farmaceutyków w próbkach środowiskowych jest trudna z uwagi na ich niewielkie stężenia, nierównomierną dystrybucję oraz obecność innych komponentów, zakłócających przebieg analiz instrumentalnych.

Zakład Analizy Środowiska Wydziału Chemii UG, kierowany przez prof. Piotra Stepnowskiego, od paru lat z sukcesem zajmuje się oznaczaniem farmaceutyków w próbkach środowiskowych. Świadczy o tym m.in. przedstawiona mi do recenzji praca doktorska mgr Magdy Caban pt. „Porównanie oraz opracowanie nowych metod oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej”. Projekt doktorski pani Caban realizowała we współpracy z dr Jolantą Kumirską. Promotorem pracy jest prof. UG Marek Kwiatkowski. Badania zaprezentowane w recenzowanym doktoracie uzyskały wsparcie finansowe Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu badawczego pt. „Poszukiwanie alternatywnych odczynników derywujących do oznaczania farmaceutyków w próbkach środowiskowych metodami chromatografii gazowej” (Nr UMO-2011/01/N/ST4/02478). Do swoich badań Doktorantka wytypowała powszechnie stosowane leki z grupy  $\beta$ -blokerów (6),  $\beta$ -agonistów (2), niesteroidowych leków przeciwzapalnych i przeciwbólowych (8) oraz związków estrogennych (5).

Recenzowana rozprawa liczy 191 stron, a jej układ jest typowy. Dysertacja rozpoczyna się od dokładnego wykazu stosowanych skrótów. Dalej następuje krótki wstęp i część teoretyczna, która jest 44-stronicowym przeglądem literatury, ściśle związanym z prowadzonymi badaniami. Doktorantka przedstawia w niej charakterystykę wybranej do badań grupy leków, ich analitykę techniką SPE-GC, omawia efekty matrycowe i sposoby oceny odzysku analitów oraz przedstawia technologie stosowane w Oczyszczalni Ścieków Gdańsk-Wschód. Po sformułowaniu celu pracy następuje opis części doświadczalnej (30 stron), omówienie wyników (80 stron) i podsumowanie. Cytowana literatura zawiera 247 pozycji.



DZIEKANAT  
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 10.06.2013 80-952 Gdańsk, ul. Sobieskiego 18, ☎ (58) 523-53-20, 📠 (58) 523-54-72

L.dz. JPLP ✉ [beatal@chem.univ.gda.pl](mailto:beatal@chem.univ.gda.pl), <http://www.chem.univ.gda.pl/zchc>

Realizację celu pracy Doktorantka rozpoczęła od oceny przydatności komercyjnie dostępnych środków silylujących i acylujących do derywatywacji  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów. Mgr Caban przetestowała kilkanaście różnych środków silylujących i acylujących, badając jednocześnie wpływ rozpuszczalnika, temperatury i czasu trwania procesów derywatywacyjnych na ich efektywność. Zderywatywowane farmaceutyki analizowała z wykorzystaniem techniki GC-FID oraz GC-MS. Ostatecznie, za najkorzystniejsze warunki derywatywacji  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów Doktorantka uznała zastosowanie BSTFA z dodatkiem 1% TMCS. Te wyniki pracy doktorskiej są podstawą publikacji autorstwa M. Caban i współpracowników, która ukazała się w *Journal of Chromatography A* (IF 4,5).

W kolejnym etapie projektu doktorskiego mgr Caban zaproponowała użycie nieopisanego dotąd w literaturze odczynnika, który nazwała akronimem DIMETRIS. Odczynnik ten powstaje z wymieszania chloro(dimetylo)trifluoropropylsilanu (CDMTFPS) z dietyloaminą. Tych informacji brakuje mi w zaproponowanym akronimie. Nazwa DIMETRIS jest krótka i brzmi dobrze, ale nie mówi o tym, że odczynnik ten jest spochodnioną dietyloaminą i że zawiera w swojej strukturze atomy fluoru. DIMETRIS zawiódł jako odczynnik do wykrywania analitów za pomocą detektora ECD. Nie zmienia to faktu, że okazał się bardzo skutecznym środkiem derywatyującym leki ze wszystkich badanych grup już w temperaturze 30 °C. Zastosowanie DIMETRIS do derywatywacji  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów zostało opisane w publikacji autorstwa M. Caban i współpracowników, która została przyjęta do druku w *Analytica Chimica Acta* (IF 4,5).

W pracy doktorskiej mgr Caban nie tylko opracowuje nowe warunki derywatywacji i analizy farmaceutyków. Doktorantka również trafnie diagnozuje i rozwiązuje problemy, które Ona i inni badacze napotykać w trakcie prowadzonych analiz. Temu poświęcony jest rozdział o silylowaniu 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu (EE2). W oparciu o prosty eksperyment p. Caban udowodniła, że komplikujący analizy rozpad tego farmaceutyku do estronu (E1) dotyczy wyłącznie monopodstawionej pochodnej EE2. Dodam tylko, że z chemicznego punktu widzenia rozpad ten jest uzasadniony ponieważ EE2 jest produktem addycji nukleofilowej anionu acetylenkowego do grupy karbonylowej E1. W wysokiej temperaturze dozownika GC może nastąpić odwrócenie tej reakcji, w szczególności że eliminowana jest trwała, gazowa cząsteczka acetyleny.

Innym przykładem kreatywności mgr Caban jest opracowanie uniwersalnej procedury określania efektów matrycowych, efektywności ekstrakcji oraz odzysku bezwzględne. Schemat obliczania wspomnianych parametrów został opublikowany w *Journal of Chromatography A* (IF 4,5) w formie artykułu autorstwa M. Caban i współpracowników.

W kolejnym etapie pracy doktorskiej p. Caban zoptymalizowała proces izolacji i wzbogacania leków z grupy  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów z wodnych próbek środowiskowych. W toku badań

scharakteryzowała i wyjaśniła mechanizm powstawania efektów matrycowych, które mają miejsce podczas oznaczania analitów z wykorzystaniem techniki SPE-GC/MS. Wskazała na konieczność częstego czyszczenia dozownika GC i zaproponowała dodawanie do ekstraktów analizowanych próbek wzorca wewnętrznego, nieulegającego derywatacji.

Efektom recenzowanej pracy doktorskiej jest opracowanie dwóch procedur oznaczania wybranych leków w wodnych próbach środowiskowych z wykorzystaniem techniki SPE-GC/MS(SIM). Pierwsza procedura dotyczy  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów w postaci trimetylosililowych pochodnych. Druga procedura dotyczy farmaceutyków wszystkich czterech badanych grup, derywatyzowanych za pomocą DIMETRIS. Obie procedury poddano walidacji, która potwierdziła możliwość ich stosowania do analiz śladowych. W związku z powyższym, Doktorantka wykorzystwała opracowane procedury do oznaczeń pozostałości leków w ściekach surowych i oczyszczonych, pochodzących z Oczyszczalni Ścieków Gdańsk-Wschód oraz w wodzie Zatoki Gdańskiej. Wśród czterech badanych grup farmaceutyków najczęściej identyfikowała leki z grupy NLPZ, w szczególności ketoprofen i ibuprofen. Najwyższe stężenia badanych farmaceutyków odnotowała w próbkach pochodzących z oczyszczalni ścieków, zarówno surowych jak i oczyszczonych. Woda morska zawierała również niektóre leki z grupy NLPZ,  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów, ale w stężeniu względnie niskim.

Patrząc całościowo na recenzowaną pracę doktorską chciałabym podkreślić dwie kwestie. Pierwsza to jej wielowątkowość, która wynika ze wspomnianej kreatywności Doktorantki, a która nie ułatwia lektury pracy. Druga to bardzo duża dbałość Doktorantki o przejrzystość przedstawionych rysunków, wykresów, tabel oraz szczegóły, takie jak prawidłowa nomenklatura czy dokładna korekta. Ta druga kwestia rekompensuje trochę trudny styl Autorki.

Z obowiązku recenzenta zamieszczam poniżej parę uwag i pytań do pracy:

1. Str. 26: W dyskusji o sposobie wydalania farmaceutyków z organizmu dopatruję się pewnego niezrozumienia poruszanych zagadnień. Otóż, enzym o którym pisze Doktorantka nie jest  $\beta$ -glukonidazą tylko  $\beta$ -glukuronidazą. Enzym ten nie hydrolizuje wiązania estrowego w glukuronianie (ester) tylko w  $\beta$ -glukuronidzie (glikozyd). Farmaceutyki bowiem są usuwane z organizmu w postaci siarczanów (estry) lub w postaci glikozydów kwasu glukouronowego.
2. Str. 34: Błąd w Tabeli 6, dotyczący PPOH.
3. Str. 37: Chemia jest bardzo sformalizowaną nauką i wymaga, żeby w stanie przejściowym (Rys. 6) wiązania rozrywane i tworzone rysować linią przerywaną. W przeciwnym razie wychodzi na to, że krzem jest pięciowiązalny.
4. Str. 101: Doktorantka słusznie stwierdza, że „efektywność reakcji derywatacji zależy w głównej mierze od zasadowości grupy odchodzącej odczynnika”. Jak w takim razie tłumaczyć,

przyznam że dla mnie niezrozumiałą, fenomen działania DIMETRIS i analogicznych odczynników sililujących, które są zderywatyzowanymi pochodnymi dietyloaminy. Dodam, że grupa aminowa jest jedną z najgorszych grup odchodzących w reakcjach substytucji nukleofilowej.

5. Dalej str. 101: Doktorantka również słusznie stwierdza, że TMCS nie reagował z analizowanymi lekami „prawdopodobnie z powodu braku pirydyny w układzie”. Rola pirydyny, lub innej zasady trzeciorzędowej, jest moim zdaniem nie do przecenienia w przypadku  $\beta$ -blokerów i  $\beta$ -agonistów. W przypadku jej braku to grupa aminowa farmaceutyków neutralizuje wydzielający się HCl. Skutkuje to utratą właściwości nukleofilowych farmaceutyku.

6. Str. 112: Stwierdzenie: „W odróżnieniu od BSTFA + 1% TMCS, odczynnik DIMETRIS nie reaguje z grupami aminowymi, przyłączając podstawnik do grup hydroksylowych.” zaprzecza stwierdzeniu z poprzedniej strony: „Miejsce podstawienia atomów wodoru w lekach nie zależało od użytego odczynnika sililującego – z zastosowaniem BSTFA + 1% TMCS, MTBSTFA i DIMETRIS występowało w tych samych miejscach cząsteczki.”

7. Dalej str. 112: Nie mogę się zgodzić ze stwierdzeniem: „Należy dodać, że właściwości nukleofilowe atomu azotu w odczynniku TMSI (atom azotu wbudowany w pierścień aromatyczny) są większe niż w DIMETRIS (atom azotu w łańcuchu alifatycznym).” Bardziej nukleofilowy jest alifatyczny atom azotu.

8. Tabela 36 i 38: Jak wytłumaczyć fakt, że analizy prowadzone za pomocą BSTFA + 1% TMCS wskazują na „spowolnioną aktywność osadu czynnego” w oczyszczalni ścieków zimą, podczas gdy analizy prowadzone za pomocą DIMETRIS na to nie wskazują?

#### Wniosek końcowy

Podsumowując, p. Magda Caban zrealizowała bardzo obszerny i niebanalny projekt doktorski. Wykonana przez Doktorantkę praca wymagała dokładności i biegłości, zarówno w odniesieniu do prowadzonych syntez jak i analiz. Nie sprowadzała się jednak wyłącznie do tego. Mgr Caban zaproponowała swojemu środowisku naukowemu uniwersalne rozwiązania wspólnych problemów oraz nowy odczynnik derywatyzujący. Jest to Jej dużym sukcesem. Uzyskane wyniki są bardzo wartościowe i wnoszą istotny wkład w badania pozostałości farmaceutyków w wodnych próbkach środowiskowych. O jakości prezentowanych w dysertacji wyników najlepiej świadczy fakt, że zostały one opublikowane w trzech bardzo dobrych, wymienionych wcześniej, czasopismach. Pani Caban jest pierwszym autorem tych publikacji. Niezależnie od tego mgr Caban jest współautorem trzech innych, równie wartościowych prac. Dlatego, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja pt. „Porównanie oraz opracowanie nowych metod oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej” spełnia wszelkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o Tytule

Naukowym i Stopniach Naukowych (Dz. U. 2003; Nr 65, poz. 595 z 14 marca 2003). Tym samym, wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie mgr Magdy Caban do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na wspomniane wyżej walory recenzowanej pracy składam też wniosek do Rady Wydziału Chemii o wyróżnienie doktoratu mgr Magdy Caban.

Gdańsk, 10.06.2013r.

Beata Liberek