

Prof. dr hab. inż. Marek Biziuk,
prof. zw. Politechniki Gdańskiej
Wydział Chemiczny
Politechniki Gdańskiej

Gdańsk 03.06.2013

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr

Magdy Ewy CABAN

zatytułowanej

Porównanie oraz opracowanie nowych metod oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej

wykonanej w Zakładzie Analizy Środowiska, Instytutu Ochrony Środowiska i Zdrowia Ludzkiego, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego pod kierunkiem dr hab. inż. Marka Kwiatkowskiego, prof. UG

Z dużym zainteresowaniem przeczytałem przesłaną mi do recenzji pracę mgr Caban, dotyczy ona bowiem bardzo ważnego problemu związanego z obecności w środowisku farmaceutyków i ich metabolitów oraz ich wpływu na ekosystemy, w tym także na człowieka. Problem ten był do niedawna bagatelizowany, a przecież Polska znajduje się w czołówce światowej jeśli chodzi o sprzedaż leków na głowę mieszkańca. Do tego dochodzi duża ilość farmaceutyków stosowana w hodowli zwierząt i to nie tylko w celach sanitarnych, ale także np. w celu przyspieszenia wzrostu masy osobników, czy zwiększenia osiągnięć sportowych koni. Istniejące systemy oczyszczania ścieków nie zapewniają wystarczającej eliminacji z nich farmaceutyków. Po dostaniu się do środowiska leki mogą oddziaływać negatywnie na żywe organizmy, powodować lekooporność bakterii a nawet feminizację niektórych gatunków. Są to w większości związki endokrynne, zakłócające układy hormonalne organizmów wyższych a przede wszystkim człowieka. Dla człowieka najczęstszą drogą przedostawania się pozostałości leków do organizmu jest woda pitna i żywność. Doktorantka słusznie zwróciła uwagę na cztery, najbardziej popularne, a jednocześnie najbardziej zagrażające człowiekowi, grupy leków: β -blokery, β -agonisty, niesteroidowe leki przeciwzapalne i przeciwbólowe oraz związki o działaniu estrogennym. Badanie losów związków organicznych w środowisku jest zagadnieniem niezmiernie skomplikowanym, pracochłonnym, czasochłonnym i, co jest najważniejsze, wymagającym nowoczesnego wyposażenia oraz wysoko wykwalifikowanej kadry. Nic więc dziwnego, że badaniami tego typu zajmuje się na świecie niewiele laboratoriów. W Polsce takie badania



DZIĘKANIA
Wydziału Chemii UG

Wpłynęło dn. 3.06.2013
L.dz. JPIP

prorowadzone są w Zakładzie Analizy Środowiska, Instytutu Ochrony Środowiska i Zdrowia Ludzkiego, Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego, w którym Doktorantka wykonywała swoją pracę, a więc miała ona możliwość wykorzystania dotychczasowych już istniejących opracowań oraz doświadczenia pracujących tam ludzi. Badania, będące treścią recenzowanej pracy, szczególnie opracowanie i zvalidowanie metodyk oznaczania pozostałości farmaceutyków w środowisku, a także oszacowanie rzeczywistych zagrożeń wynikających z ich obecności, należy uznać za niezmiernie istotne. Był to więc program szeroki i ambitny. Doktorantka miała szansę (i ją wykorzystała) do nabycia nowych doświadczeń, a szczególnie nowoczesnego podejścia do badania losów farmaceutyków w środowisku, w szerokim pojęciu tego słowa. Generalnie koncepcję pracy oceniam bardzo wysoko i dobrze się stało, że taka praca powstała. Należy wyrazić duże uznanie dla autorki, że podjęła się realizacji tak ważnego, a jednocześnie trudnego w realizacji tematu.

W skład recenzowanej rozprawy wchodzi: Wstęp, Część teoretyczna, Cel pracy, Część doświadczalna, Wyniki i ich omówienie, Podsumowanie i wnioski, a także Literatura oraz Wykaz stosowanych skrótów i akronimów, co znacznie ułatwia lekturę. Jest to klasyczny układ rozpraw doktorskich. Brak jest streszczenia w języku angielskim, które umożliwiłoby zapoznanie się z głównymi tezami pracy, a szczególnie wynikami i wnioskami, także zainteresowanym tematem, którzy nie znają języka polskiego. Łącznie praca obejmuje 191 stron, zawiera 51 rysunków i 40 tabel. Brak jest jednak spisu tabel i rysunków.

W części literaturowej Doktorantka opisała problemy związane z występowaniem farmaceutyków w środowisku, charakterystykę wybranych grup leków, ich zachowanie się w środowisku i toksyczność, procesy ich eliminacji ze środowiska oraz oznaczanie pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych z wykorzystaniem techniki SPE-GC ze szczegółowym omówieniem derywatywacji, często koniecznej przy wykorzystaniu techniki GC. Ciekawe są rozdziały poświęcone efektom matrycowym oraz metodom ich eliminacji. Doktorantka nie wspomina jednak o najważniejszej metodzie eliminacji efektów matrycowych, czyli o materiałach odniesienia. Technologie stosowane w Oczyszczalni Ścieków Gdańsk-Wschód równie dobrze mogłyby się znaleźć w Części doświadczalnej przy opisie badań ścieków surowych i oczyszczonych. Brak w tym rozdziale, jak i w całej pracy konsekwencji w używaniu określeń *analizować* i *oznaczać*. Analizuje się lub bada próbkę, a oznacza w niej anality. Chromatografia gazowa jest techniką rozdzielania, a nie oznaczania. Razi trochę użycie zwrotu *badania (leku) na ryżówce japońskiej*, chodzi raczej o *badania wpływu (leku) na ryżówkę japońską*. Polemizowałbym też ze stwierdzeniem Doktorantki, że ultra-sprawna chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas jest dzisiaj rutynowo stosowana do analiz środowiskowych. SIM to *detekcja wybranego jonu* a nie *detekcja na wybranym jonie*. W rozdziale tym Doktorantka wykazała się interdyscyplinarnymi wiadomościami z zakresu chemii i farmacji. Obszerna i wyczerpująca część teoretyczna jest dobrym wprowadzeniem do pracy i bardzo dobrze uzasadnia jej cel.

Może być również dobrym materiałem do monografii lub artykułu popularno-naukowego.

Najważniejszą częścią każdej pracy doktorskiej są jednak wyniki, ich dyskusja oraz wnioski. Poza ilością prezentowanych wyników uderza duża dojrzałość i dociekliwość w interpretacji oraz wyciąganiu wniosków z przeprowadzonych badań, także w przypadku wyników negatywnych. Obszerny program badawczy został dobrze zaplanowany i przeprowadzony. Cenne jest opracowanie warunków derywatywacji wybranych analitów poprzez dobór najkorzystniejszych parametrów tego procesu, w tym rodzaju odczynnika, rodzaju rozpuszczalnika oraz czasu i temperatury derywatywacji, a także parametrów układu chromatograficznego, zastosowanego do oznaczania końcowego. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka sama przeprowadziła syntezę komercyjnie niedostępnych odczynników do derywatywacji oraz porównała skuteczności działania aż dziewięciu odczynników do derywatywacji wybierając najbardziej skuteczne. Czy przeprowadzono jednak jakieś badania dotyczące ewentualnych strat analitów w trakcie odparowania do sucha. O tej możliwości Doktorantka wspomina w dalszej części pracy. Poza tym, uważam, że w polskim języku powinno się stosować nazwę *wkładka* a nie *insert*, a określenia *analiza GC/FID*, *GC/MS*, *chromatogram analizy*, *chromatogram GC/MS*, *detekcja ECD* czy *MS* to skróty myślowe. Doktorantka opracowała również metody izolacji i wzbogacania leków z wodnych próbek środowiskowych dobierając rodzaj kolumniek ekstrakcyjnych, pH próbki wodnej oraz rodzaj rozpuszczalnika przemywającego i wymywającego, a następnie przeprowadziła walidację całych metodyk oznaczania wybranych farmaceutyków z wykorzystaniem technik GC/MS(SIM) oraz SPE-GC/MS(SIM) do oznaczania β -blokerów i β -agonistów w postaci trimetylosililowych pochodnych oraz siedemnastu leków w postaci dimetylotrifluoropropylsililowych pochodnych. Wyznaczono granicę wykrywalności i oznaczalności, liniowość, zakres pomiarowy, precyzję oraz prawdziwość metody.

Opracowane metodyki zostały z powodzeniem zastosowane do oznaczania pozostałości farmaceutyków w wodnych próbkach środowiskowych o zróżnicowanych matrycach, od wody wodociągowej, przez wodę morską i ścieki oczyszczone po ścieki surowe. Ważnym i ciekawym etapem pracy było sprawdzenie wpływu matrycy (substancji przeszkadzających) na wynik oznaczenia, a szczególnie na wartość odzysku analitów z próbek środowiskowych oraz przedyskutowanie sposobów identyfikacji pochodnych z użyciem techniki spektrometrii mas. W trakcie wykonywania eksperymentów Doktorantka wykazała dużą spostrzegawczość identyfikując efekty zakłócające analizę oraz dając praktyczne rady jak te problemy rozwiązać. Wyniki przedstawiono w postaci tabel i wykresów. Podawana są jednak w tabelach ze zbyt dużą liczbą cyfr znaczących, szczególnie w tabelach 36, 37, 38, 39 i 40. Cztery, a nawet pięć cyfr znaczących w wynikach dotyczących analizy środowiskowej to chyba zbyt dużo, zresztą uniemożliwia to duża niepewność wyników. Przedziały ufności, odchylenie standardowe czy niepewność wyniku podaje się, poza tym, tylko z dwiema cyframi znaczącymi. Niefortunne jest także użycie, w przypadku

próbek środowiskowych, określenia *frekwencja detekcji*. Do ciekawych wniosków wynikających z niniejszej pracy zaliczyłbym również wnioski dotyczące efektywności derywatywacji wraz z próbą wyjaśnienia mechanizmów podstawiania w cząsteczce analitu różnych grup funkcyjnych. Rozważania te świadczą o dobrej znajomości chemii organicznej. Badania własne omawiane były na tle wyników prac innych badaczy, czasem polemizując z nimi, ale najczęściej badania innych naukowców potwierdzały wnioski i hipotezy stawiane przez Doktorantkę. Cytowana literatura jest obszerna (247 pozycji) i bardzo aktualna. Zdecydowana większość cytowanej literatury pochodzi z lat 1995-2012. Świadczy to o skrupulatnym zapoznaniu się Doktorantki z najnowszymi osiągnięciami w omawianej dziedzinie. Zastanawia brak zwyczajowych skrótów tytułów czasopism. Przy podawaniu źródeł internetowych należy podawać datę dostępu, gdyż źródła te mogą być zmieniane.

Podsumowując, należy z uznaniem podkreślić świetnie zaplanowany i zrealizowany obszerny program badań, przeprowadzonych po raz pierwszy na taką skalę, opracowanie i zwalidowanie dwóch metodyk oznaczania pozostałości w środowisku najgroźniejszych dla człowieka farmaceutyków, zastosowanie opracowanych metodyk do oznaczania wybranych związków w próbkach wodnych o zróżnicowanym składzie, ogrom wyników oraz inteligentne wnioskowanie. Praca napisana jest ładną polszczyzną, a na specjalne podkreślenie zasługuje staranna edycja, szczególnie duża ilość rysunków i tabel bardzo poglądowo prezentujących otrzymane wyniki. Doktorantka popełniła w tekście pracy stosunkowo niewiele błędów nomenklaturowych i stylistycznych. Błędy stylistyczne, literówki i interpunkcje zaznaczyłem w tekście pracy i omówiłem z autorką. Chciałbym jedynie zwrócić uwagę na pewne potknięcia. „Żargonem pracownianym” wydają mi się takie określenia, jak: *standardy* zamiast *wzorce*, *zsyntetyzowano* zamiast *zsyntezowano*, *rozkład* zamiast *destrukcja lub mineralizacja*, *rozdział* zamiast *rozdzielanie*, *reagent* zamiast *odczynnik*, *nastrzyk* zamiast *dozowanie*, *ekstrakcja (ekstrakt) próbki* zamiast *ekstrakcja (ekstrakt) z próbki*, *poddano procedurze analitycznej* zamiast *przeprowadzono analizę*, *koncentracja* zamiast *stężenie*, *analiza śladów* zamiast *analiza śladowych zawartości*, czy *opartą o metodę* zamiast *opartą na metodzie*. W przypadku farmaceutyków możemy mówić o zanieczyszczeniu a nie o skażeniu. Skażenie dotyczy mikroorganizmów lub substancji promieniotwórczych. Wyniki mogą być *miarodajne*, a nie *wiarygodne*. Liczbę i wymiar zawsze oddziela się spacją, nawet w przypadku % i °C. Określenie *optymalizacja* jest zarezerwowane dla procedur statystycznych, takich jak metoda simpleksów, plany Placketta-Burmana, plany kompozycyjne Boxa-Huntera itp. W przypadkach opisywanych w pracy jest to dobór najkorzystniejszych parametrów procesu. Niezręczne jest określenie *badania nad czymś*. Bada się próbkę, a nie nad próbką. Niestety, zdarzały się też błędy w nazwie podstawowej w pracy techniki, spektrometrii mas. Nie ma widma ani detektora masowego, jest w tym przypadku detektor mas. Rysunek X, Tabela Y, Województwo Pomorskie, jako nazwy własne, należy pisać z dużej litery. Po tytułach rysunków i tabel nie stawia się kropki.

Moje uwagi krytyczne co do redakcyjnej strony pracy nie umniejszają jednak jej dużej wartości merytorycznej. Przeprowadzone i zaprezentowane w pracy badania zawierają dużo elementów nowości naukowej. Pracę czyta się z dużym zainteresowaniem i może być ona źródłem ciekawych informacji dla wszystkich naukowców i studentów zajmujących się badaniem losu środowiskowego farmaceutyków. Doktorantka zrealizowała obszerny i ambitny program badań. Wyniki pracy zostały już częściowo opublikowane (3 w *Journal of Chromatography A* i po jednej w *Analytica Chimica Acta*, *Science of the Total Environment* i *Journal of Chemometrics*). Szkoda, że w pracy nie znalazło się zestawienie dorobku naukowego Doktorantki. Uważam, że recenzowana praca spełnia wszelkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Magdy Ewy Caban do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres pracy, dużą liczbę wyników, nowość naukową opracowanych i zwalidowanych metod oznaczania farmaceutyków w wodach oraz inteligentne wnioskowanie wnoszę również o wyróżnienie rozprawy. Pani mgr Caban posiada w swym dorobku 3 publikacje z zakresu tematyki doktoratu opublikowane w czasopiśmie z Listy Filadelfijskiej (o $IF > 4$), w których jest pierwszą autorką. Na podkreślenie zasługuje też uczestnictwo w wielu konferencjach krajowych i zagranicznych, na których prezentowała wyniki swoich badań i konfrontowała je z szerokim środowiskiem naukowym.

Prof. dr hab. inż. Marek Biziuk,
prof. zw. PG