

Toruń, dnia 18 stycznia 2019 r.

dr hab. Renata Gadzała-Kopciuch, prof. UMK
Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Chemii
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Recenzja

pracy doktorskiej Pani mgr Pauliny Łukaszewicz
pt. „*Opracowanie procedury ekstrakcji i oznaczania wybranych leków weterynaryjnych w glebach
oraz ocena ich stabilności hydrolitycznej*”
wykonanej w Katedrze Analizy Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego

Ocena wyboru tematyki badawczej

W nieustanny sposób nasze środowisko bombardowane jest przez różne, często toksyczne, substancje, które ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne ulegają licznym przemianom takim jak biodegradacja, mineralizacja czy transformacja oraz kumulacji. Do tych substancji można niewątpliwie zaliczyć produkty lecznicze weterynaryjne syntetyczne (chemiczne), do których zalicza się m.in. antybiotyki, leki przeciwpasożytnicze, przeciwbólowe, przeciwzapalne, przeciwnowotworowe, hormony, witaminy, mikro- i makroelementy. Szybkość i zakres przemian tych substancji zależy nie tylko od struktury chemicznej i stężenia danego związku, ale również od warunków panujących w poszczególnych elementach ekosystemu (temperatura, wilgotność, obecność materii organicznej, itp.). Brak kontroli i monitorowania pozostałości leków weterynaryjnych zwłaszcza w środowisku glebowym, a przede wszystkim brak uregulowań prawnych określających ich zawartości, stanowią potencjalne zagrożenie dla organizmów żywych. Dlatego też, niezbędne jest wnikliwe poznanie możliwie wszystkich przemian i migracji tych leków oraz poszukiwanie nowych rozwiązań w zakresie selektywnych i czułych metod izolowania i oznaczania badanych analitów.

Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej w pełni wpisuje się w nurt badań dotyczący opracowania nowych narzędzi analitycznych umożliwiających opis nie do końca jeszcze poznanych przemian leków weterynaryjnych w środowisku glebowym. W mojej ocenie bardzo dobrze przemyślany i zaplanowany został zakres badań, a na wysokim poziomie stała ich realizacja, mająca na celu optymalizację warunków izolowania wybranych leków, wzbogacania i oczyszczania ekstraktów gleb oraz dobór optymalnych parametrów rozdzielania za pomocą chromatografii cieczowej połączonej z różnymi detektorami. Czynności te, niezbędne do przeprowadzenia oceny stabilności hydrolitycznej tych związków w glebach, wymagały od młodego naukowca usystematyzowanej wiedzy nie tylko z dziedziny chemii analitycznej, ale także z zakresu gleboznawstwa. Wszystkie te umiejętności Pani mgr Paulina Łukaszewicz zdobyła realizując swoje badania w zespole naukowym kierowanym przez Pana Profesora

Piotra Stepnowskiego, który jest uznanym w świecie naukowym autorytetem w badaniach toksyczności i ekotoksyczności substancji leczniczych obecnych w środowisku oraz efektów biologicznych jakie one powodują. Efekt pracy w takim zespole oraz wykorzystanie wiedzy i umiejętności zdobytych podczas realizacji zadań badawczych jest bardzo widoczny, ponieważ zaowocował trzynastoma publikacjami z listy filadelfijskiej o średnim współczynniku oddziaływania $IF=3,562$.

Ocena merytoryczna rozprawy

Doktorantka postawiła sobie bardzo ambitny cel, którym było opracowanie procedur analitycznych umożliwiających selektywne izolowanie z gleb oraz końcowe oznaczenie na niskim poziomie stężeń osiemnastu substancji leczniczych z grupy tetracyklin, sulfonamidów, makrolidów, fluorochinolonów, β -blokerów, fenikoli, benzimidazoli i nitroimidazoli oraz trimetoprin. Efektem przeprowadzonych prac badawczych było wdrożenie tych procedur do oceny stabilności hydrolitycznej wybranych leków. Jako metodę przygotowania próbek Doktorantka wybrała ekstrakcję za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE) z oczyszczaniem ekstraktów z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Natomiast do oznaczania wybranych analitów zaproponowana została chromatografia cieczowa z detekcją spektrofotometryczną i spektrometrią mas.

Dokonując formalnej oceny przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej można stwierdzić, że liczy ona 150 stron, zilustrowana jest 33 rysunkami, zawiera 25 tabel i wydana jest w formie książkowej. Dysertacja posiada klasyczny układ i została podzielona na następujące rozdziały: wstęp i część literaturowa (35 stron), cel pracy (2 strony), część eksperymentalna, w której ujęto szczegółowy opis metodyk zaplanowanych badań (24 strony), zestawienie wyników i ich dyskusja (56 stron), podsumowanie (3 strony) oraz spis literatury. Tytuł przedłożonej rozprawy doktorskiej w pełni oddaje treść zawartą zarówno w części teoretycznej, jak i eksperymentalnej oraz ściśle koreluje z uzyskanymi wynikami badań. Pracę rozpoczyna krótki wstęp stanowiący zwięzłe zapoznanie z tematyką badawczą oraz uzasadnienie jej podjęcia.

W części teoretycznej, opartej na studiach literaturowych, Doktorantka wykorzystala materiał bibliograficzny, który odzwierciedla aktualny stan wiedzy związany z występowaniem pozostałości leków w środowisku, ich migrację oraz przemiany jakim mogą one ulegać: sorpcji, biodegradacji, fotolizie i hydrolizie. Aby podkreślić wagę zagrożenia jakie niosą farmaceutyki weterynaryjne, w rozdziale 1.1.2 zestawiono dane o ilości sprzedawanych leków oraz ich konsumpcji w latach 2011-2015. Kolejny rozdział stanowi wartościowy materiał informacyjny, który może być zaproponowany młodemu analitykom zajmujących się badaniem przemian leków w środowisku, jako cenna i pouczająca lektura wprowadzająca. Ostatni z rozdziałów tych studiów literaturowych dotyczący metod izolowania, oczyszczania, wzbogacania i końcowego oznaczania wybranych farmaceutyków, wymagał ogromnego nakładu pracy oraz żmudnych studiów literaturowych. W formie tabeli zaprezentowane zostały osiągnięcia licznych grup badawczych zajmujących się izolowaniem i oznaczaniem leków będących w kręgu

zainteresowań Pani mgr Pauliny Łukaszewicz. Należy podkreślić, że ten krótki zarys osiągnięć innych badaczy został przygotowany na podstawie 204 bardzo aktualnych doniesień literaturowych. Niewątpliwe, tak wnikliwe studia literaturowe i zdobyta podczas tych studiów wiedza były bardzo pomocne Doktorantce w dojrzałej interpretacji uzyskanych wyników.

W rozdziale czwartym Doktorantka dyskutuje swoje wyniki, poprzedzone szczegółowo opisanymi we wcześniejszych podrozdziałach metodykami dotyczącymi izolowania leków z gleb, oczyszczania uzyskanych ekstraktów oraz ich oznaczaniem, przechodząc płynnie do omówienia rezultatów uzyskanych w trakcie tych analiz. Pierwsza część zestawionych wyników i ich interpretacja dotyczy doboru warunków chromatograficznych oraz detekcji spektrofotometrycznej do rozdzielenia i identyfikacji trzech leków z grupy tetracyklin oraz siedmiu innych leków: metronidazolu, sulfadiazyny, sulfadimetoksyny, sulfametoksazolu, tylozyny, endrofloksacyny i trimetoprimu. Uzyskane wyniki miały stanowić wstępne warunki do oznaczania wybranych leków za pomocą chromatografii ciekowej połączonej ze spektrometrem mas. W mojej opinii, nie do końca wydaje się uzasadniona walidacja każdej z opracowanych metod oznaczania dla wybranych analitów, gdyż HPLC-UV nie było w dalszych eksperymentach wykorzystane do ilościowego oznaczania siedmiu związków oznaczonych jako MIX_7. W kolejnym rozdziale Doktorantka zamieściła wyniki uzyskane podczas ekstrakcji leków weterynaryjnych z próbek gleb oraz oczyszczania otrzymanych ekstraktów z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej z różnymi sorbentami (Oasis[®]HLB, Strata[™]-X, Strata C18-E). Ta część badań wymagała największego zaangażowania i niewątpliwe był to najbardziej czasochłonny etap prac. Pani mgr Paulina Łukaszewicz dokonała doboru temperatury i czasu ekstrakcji oraz składu mieszaniny ekstrakcyjnej. Dla mieszaniny trzech leków (MIX_3) wybrano pięć różnych mieszanin ekstrakcyjnych, a w przypadku mieszaniny siedmioskładnikowej (MIX_7), aż osiemnaście. Za najefektywniejszą mieszaninę do ekstrakcji MIX_3 i MIX_7 uznano 10% roztwór azotanu(V) magnezu i chlorku amonu (9:1, v/v) z dodatkiem metanolu przy zastosowaniu temperatury 60°C i czasie ekstrakcji 30 min (trzy cykle po 10 min). Na podstawie uzyskanych wyników, do oczyszczania ekstraktów glebowych wykorzystano wypełnienie polimerowe STRATA[™]-X, które zapewnia szeroką gamę oddziaływań (wiązańia wodorowe, oddziaływania typu π - π , oddziaływania hydrofobowe) z analitem. Wyznaczone wartości odzysku bezwzględnego i względnego oraz efekt matrycowy dla wybranych leków ekstrahowanych z dwóch gleb różniących się zawartością materii organicznej (3% i 8,3%) spełniają kryteria akceptacji dla wybranych ostatecznie warunków ekstrakcji i oczyszczania ekstraktów. Metodyka ta została zweryfikowana poprzez wykorzystanie jej do oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych w czterdziestu próbkach gleb rolniczych (rozdział 4.4) pobranych z terenów Polski północnej. Zidentyfikowano większość z badanych związków na poziomie od 3,6 do 57 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Z punktu widzenia innowacyjności przeprowadzonych badań należy uznać, że wyniki otrzymane z testu oceny stabilności hydrolytycznej uzyskane dla dwunastu wybranych leków weterynaryjnych oraz charakterystyka potencjalnych produktów ich

degradacji bez wątplenia stanowią nowość naukową i mają duży potencjał praktyczny. Rezultaty tych badań wykazały, że większość z tych leków wykazuje wysoką trwałość, a tylko leki z grupy benzimidazoli i tylozyna ulegały w największym stopniu degradacji.

Podsumowując tę część oceny dysertacji uważam, że cel pracy doktorskiej został w pełni zrealizowany a uzyskane z dużą starannością wyniki badań należy uznać za istotny wkład w opracowanie pełnych metodyk mających na celu wyizolowanie wybranych leków weterynaryjnych i ich ilościowe oznaczenia. Pani mgr Paulina Łukaszewicz wykazała, że opracowane procedury przynoszą wymierne korzyści w postaci nowych narzędzi analitycznych do oceny stabilności hydrolitycznej dla dwunastu wybranych środków farmaceutycznych zgodnie z wytycznymi Organizacji Współpracy Gospodarczej i Rozwoju (OECD).

Uwagi szczegółowe

Trudno oceniać pracę, której wyniki badań przeszły szczegółowy proces weryfikacji pod kątem stawianych pracom oryginalnym przez redakcje międzynarodowych czasopism z listy *Journal Citation Reports*, w których zostały opublikowane. Dodatkowo poddawane były one niezależnej ocenie merytorycznej przez recenzentów będących przeważnie autorytetami w dziedzinie wiedzy, w której zostały opublikowane badania. Już sam fakt zaakceptowania uzyskanych wyników przez ekspertów międzynarodowych czasopism podkreśla wysoką wartość pracy Pani mgr Pauliny Łukaszewicz. W tej sytuacji, niewdzięczną rolą recenzenta jest poszukiwanie niedociągnięć w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej, co w tym przypadku okazało się „niestety”, trudne. Dlatego też poniższe pytania stanowią raczej przyczynek do dyskusji z Doktorantką, niż wskazują na uchybienia rozprawy. Proszę więc o wyjaśnienie następujących kwestii:

- Z jakiego powodu do badań nie zastosowano certyfikowanych materiałów odniesienia tylko gleby różniące się zawartością materii organicznej (3% i 8,3%)?
- Tabela 8 – Czym kierowano się przy klasyfikacji próbek pod kątem badanych analitów?
- Jaki rodzaj membrany zawierały filtry strzykawkowe wykorzystane do oczyszczania próbek? Czy badano utratę analitów na tych filtrach? W tekście wystąpiła chyba mała pomyłka, bo zapewne były to filtry 0,2 μm a nie 20 μm (s. 46).
- Str. 57 - Jak był dobierany ostatni z zastosowanych rozpuszczalników w ekstrakcji do fazy stałej? Dlaczego przy procedurze opisanej jako SPE B, rozpuszczalnik końcowy do kondycjonowania to mieszanina buforu McIlvaine'a i EDTA o pH około 4, a próbkę skorygowano do pH ok. 7?
- Dlaczego do ekstrakcji leków stosowano temperaturę 90 i 115°C skoro stwierdzono w badaniach związanych z oceną stabilności hydrolitycznej, że w temperaturze 70°C tworzą się już pochodne tych leków?
- Czym kierowano się przy doborze temperatury do oceny stabilności hydrolitycznej wybierając zakres temperatury od 10 do 70°C (str. 65). Potwierdzenie można znaleźć w podsumowaniu „*stosowanie wysokich temperatur może wpłynąć na pogorszenie efektywności ekstrakcji niektórych farmaceutyków*”.
- Rysunek 23 - Co było podstawą do przyporządkowania kinetyki pseudo-pierwszorzędowej dla flubendazolu i fluorfenikolu ? (s. 110).

Drobne uwagi dotyczące nomenklatury wynikają zapewne z niewłaściwego tłumaczenia „niezaszczepione” (str. 56, 62, itd.), „doczyszczanie” (całość pracy eksperymentalnej), „izolacja” (s. 88). Ponadto, w cytowanej literaturze zabrakło w wielu miejscach nazw czasopism. Pewne drobne błędy edytorskie pojawiają się tekście nie umniejszają one ogólnej bardzo dobrej oceny pracy.

Podsumowując uważam, że recenzowana praca doktorska dotyczy ważnego, z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, problemu skażenia środowiska pozostałościami leków weterynaryjnych oraz przemian jakim podlegają one w środowisku glebowym w zależności od zawartości materii organicznej. Opracowane metodyki analityczne spełniają w pełni założone kryteria akceptacji odnośnie: zakresu pomiarowego, liniowości, granicy wykrywalności i oznaczalności, dokładności, precyzji, selektywności/specyficzności, odzysku oraz odporności. Doktorantka sama odniosła się krytycznie do uzyskanych wyników, widząc trudności w ich interpretacji ze względu na przyjętą metodologię. Świadczy to o dojrzałości naukowej i doskonałej znajomości zagadnień diskutowanych w pracy.

Wniosek końcowy

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została zredagowana w sposób bardzo czytelny a wyniki badań zamieszczone w niej zaprezentowane zostały w przejrzysty i klarowny sposób pomimo ich imponującej ilości. Niewątpliwie, na pełne uznanie zasługuje strona edytorska. Uważna lektura rozprawy nasunęła mi nieliczne uwagi merytoryczne i nomenklaturowe, które w żaden sposób nie umniejszają jej wartości. Doktoranta dała dowód znajomości podjętej tematyki badawczej, a umiejętność zaplanowania i realizacja z ogromną starannością eksperymentów, zasługuje na uznanie i wyróżnienie. Umiejętny wybór tematu i rozwiązanie postawionych problemów powodują, że stanowi ona znaczące poszerzenie literatury.

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Łukasiewicz pt. „*Opracowanie procedury ekstrakcji i oznaczania wybranych leków weterynaryjnych w glebach oraz ocena ich stabilności hydrolitycznej*” spełnia wymagania sformułowane w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Łukasiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Równocześnie, biorąc pod uwagę aktualność problematyki, innowacyjność badań w zakresie oceny stabilności hydrolitycznej wybranych leków weterynaryjnych i charakterystyki potencjalnych produktów ich degradacji, spójność koncepcji badań, rzetelną realizację oraz ich wysoki poziom naukowy wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Denata Gaduła-Kopciuch