Dr hab. Beata Liberek, prof. UG

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Natalii Migowskiej

pt. "Opracowanie metod oznaczania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz hormonów estrogennych w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej"

Powszechna dostępność różnorodnych farmaceutyków jest dobrodziejstwem cywilizacji. Powoduje ona jednak systematyczny wzrost konsumpcji lekarstw. Wzrost ten jest ściśle skorelowany z pojawianiem się w coraz większych ilościach pozostałości farmaceutyków w środowisku. Problem obecności aktywnych związków farmaceutycznych w przyrodzie staje się więc wyzwaniem chemii i analityki środowiska. Z wyzwaniem tym, z sukcesem, zmierzyła się mgr Natalia Migowska w ramach przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej pt. „Opracowanie metod oznaczania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz hormonów estrogennych w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej". Projekt doktorski pani Migowska realizowała w Zakładzie Analizy Środowiska na Wydziale Chemii UG pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Stepnowskiego i we współpracy z dr Jolantą Kumirską. Badania zaprezentowane w recenzowanym doktoracie uzyskały wsparcie finansowe MNSW w ramach projektu badawczego pt. „Oznaczanie pozostałości farmaceutyków w próbkach środowiskowych metodą GC i GC-MS – rozwój i optymalizacja metod derywatyzacji analitów" (Nr N N204 260237; 2009-2012), którego kierownikiem była dr Jolanta Kumirska. Do swoich badań Doktorantka wytypowała niesteroidowe leki przeciwzapalne, takie jak ibuprofen, ketoprofen, naproksen, kwas salicylowy, paracetamol, flurbiprofen, diklofenak i diflunisal oraz hormony estrogenne, takie jak 17β-estradiol, estron, estriol, 17α-etynyloestradiol i syntetyczny dietylostilbestrol. Wybór farmaceutyków był w pełni uzasadniony, wziąwszy pod uwagę powszechność ich stosowania.

Recenzowana rozprawa liczy 168 stron, a jej układ jest typowy. Dysertacja rozpoczyna się od wykazu stosowanych skrótów. Dalej następuje krótki wstęp i część teoretyczna, która jest bardzo dobrze napisanym, 46-stronicowym przeglądem literatury, ściśle związanym z prowadzonymi badaniami. Czytający zapoznaje się w niej z wybranymi do analizy farmaceutykami, ich źródłami i dotychczas zdiagnozowanymi zagrożeniami, wynikającymi z ich obecności w środowisku. Dalsza lektura umożliwia poznanie metod oznaczania farmaceutyków w próbkach środowiskowych. Moje drobne uwagi do omówionego fragmentu pracy są następujące:

DZIEKANAT
Wydziału Chemii UG
Wpłynęło dn. 18.01.2013
L.dz. 8010-WCH/IP-225/13

80-952 Gdańsk, ul. Sobieskiego 18, ☎ (58) 523-53-20, 🖷 (58) 523-54-72
✉ beatal@chem.univ.gda.pl, http://www.chem.univ.gda.pl/zchc

1. W nazwie MTBSTFA (str. 6) brakuje niezbędnych w języku polskim dla grup alkilowych i sililowych końcówek -o.
2. Wydaje mi się, że definiowanie pH jako wykładnika stężenia jonów wodorowych (str. 6) jest skrótem myślowym, którego nie powinno się stosować.
3. Zdanie „Estrogeny o budowie niesteroidowej (stilbestrole) są pochodnymi *trans*-stilbenu" (str. 15) jest niefortunne i zaprzecza dalszemu wywodowi.
4. Zastanawia mnie dlaczego granicą hydrofilowości związków jest wartość logarytmu dziesiętnego ze współczynnika podziału oktanol/woda równa 1 (str. 12). Wartości log K_{ow} zawarte w przedziale 0-1 świadczą o lepszej rozpuszczalności związku w oktanolu niż w wodzie. Dlaczego więc twierdzić, że takie związki są hydrofilowe?

Realizację celu pracy Doktorantka rozpoczęła od opracowania metody przeprowadzania trzech wybranych NLPZ (ibuprofen, ketoprofen i naproksen) w estry metylowe za pomocą trimetylosililo-diazometanu (TMSD) i oznaczania końcowego analitów z wykorzystaniem chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-FID). Efektywność opracowanej przez siebie procedury derywatyzacji za pomocą TMSD porównała Doktorantka z efektywnością analogicznych, przeprowadzonych przez Nią derywatyzacji, prowadzonych przy użyciu trzech innych, stosowanych powszechnie do tego celu odczynników. Zoptymalizowana procedura z użyciem TMSD została poddana walidacji. Materiał zaprezentowany w tej części dysertacji został opublikowany w *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (IF 3,8).

W następnej kolejności mgr Migowska zajęła się opracowaniem metody derywatyzacji hormonów estrogennych, wykorzystując do oznaczenia końcowego tę samą co poprzednio metodę GC-FID. W tym celu przetestowała sześć różnych odczynników acylujących i sililujących w różnych wariantach czasowych, temperaturowych i rozpuszczalnikowych. Doktorantka na tym etapie prac napotkała ciekawe chemicznie problemy, które zdiagnozowała. Ostatecznie, zoptymalizowała warunki analizy wszystkich pięciu związków estrogennych, które przekształciła w trimetylosililowe pochodne za pomocą BSTFA z dodatkiem 1% TMCS. Dla zoptymalizowanej metody wyznaczyła parametry metrologiczne. Wyniki tej części doktoratu zostały opublikowane w *Journal of Chemometrics* (IF 1,9).

Kolejnym etapem badań mgr Migowskiej było opracowanie procedur równoczesnej derywatyzacji NLPZ i hormonów estrogennych. W pierwszej kolejności do oznaczeń końcowych Doktorantka użyła detektora wychwytu elektronów (ECD). Wymagało to przekształcenia badanej grupy farmaceutyków (cztery związki estrogenne i dwa leki przeciwzapalne) w pentafluoro-propionylowe i/lub pentafluoropropylowe pochodne. Następnie mgr Migowska dobrała

temperaturowe parametry pracy pieca chromatograficznego i detektora. Zoptymalizowaną procedurę poddała walidacji.

Równoczesną derywatyzację NLPZ i związków estrogennych Doktorantka przeprowadziła również poprzez trimetylosililowanie i oznaczenie końcowe z wykorzystaniem układu GC-MS. Na wszystkich trzynastu wymienionych na wstępie farmaceutykach mgr Migowska przetestowała dwa odczynniki sililujące (MSTFA i BSTFA + 1% TMCS) w różnych wariantach czasowych, temperaturowych i rozpuszczalnikowych. Zoptymalizowaną metodykę równoczesnego trimetylosililowania za pomocą BSTFA + 1% TMCS Doktorantka poddała walidacji. Prawdopodobnie, opracowane procedury równoczesnej derywatyzacji NLPZ i hormonów estrogennych odniesione do ciekłych próbek środowiskowych stały się podstawą pracy opublikowanej w „*Science of the Total Environment*" (IF 3,3). Piszę prawdopodobnie, ponieważ Doktorantka, wskazując materiał opublikowany w tej pracy podaje numery rozdziałów, których w dysertacji nie ma (str. 136).

Ostatnim etapem realizacji projektu doktorskiego mgr Migowskiej było zastosowanie zoptymalizowanych procedur oznaczania NLPZ oraz związków estrogennych do próbek rzeczywistych. Wymagało to opracowania metody izolacji farmaceutyków, zarówno z ciekłych jak i stałych próbek środowiskowych. Doktorantka wybrała do tego celu technikę ekstrakcji do fazy stałej. Na tym etapie badań przetestowała różne złoża do ekstrakcji, różne rozpuszczalniki, a w przypadku próbek ciekłych również różne objętości nanoszonej próbki i różny stopień jej zakwaszenia. Dla próbek stałych wypróbowała dwie metody ekstrakcji: przez wytrząsanie oraz ekstrakcję wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym. Opracowane procedury izolacji w połączeniu z opracowanymi metodami derywatyzacji i oznaczenia końcowego zastosowała p. Migowska do oznaczenia NLPZ i hormonów estrogennych w próbkach rzeczywistych. Procedura oparta o trimetylosililowanie pozwoliła Jej na wykrycie w próbkach ścieków surowych pięciu farmaceutyków, wśród których były: kwas salicylowy, ibuprofen, naproksen, diklofenak i 17α-etynyloestradiol. W próbkach ścieków oczyszczonych Doktorantka wykryła te same cztery NLPZ, ale nie stwierdziła obecności hormonów estrogennych. Spośród badanych wód powierzchniowych wolna od farmaceutyków okazała się rzeka Wierzyca, w Raduni mgr Migowska wykryła jedynie kwas salicylowy, w Wiśle kwas salicylowy i diklofenak, a w zatoce Gdańskiej kwas salicylowy, ibuprofen i naproksen. Procedura oparta o pentafluoropropionylowe i/lub pentafluoropropylowe pochodne pozwoliła Doktorantce zidentyfikować ketoprofen i dietylostilbestrol w Wierzycy oraz estron w rzece Święta. Szkoda, że mgr Migowska pozostawiała bez komentarza fakt, że stosując trimetylosililowanie nie wykryła w Wierzycy ketoprofenu i dietylostilbestrolu.

Pani Migowska dokonała także analizy rzeczywistych próbek stałych, stosując metodykę opartą o trimetylosililowanie. Najwięcej farmaceutyków (kwas salicylowy, ibuprofen, flurbiprofen,

naproksen, diklofenak, 17α-etynyloestradiol) zidentyfikowała Doktorantka w próbkach osadów ścieków pochodzących z Oczyszczalni Ścieków „Wschód" w Gdańsku. Osad pochodzący z Gdańska-Szadółek wypadł na tym tle lepiej, co nie znaczy, że dobrze. Pocieszające jest to, że w glebie Trójmiejskiego Parku Krajobrazowego, poza kwasem salicylowym, Doktorantka nie wykryła żadnych farmaceutyków.

Do omówionej powyżej zasadniczej części dysertacji, mam następujące uwagi i pytania:

1. W tej części pracy, nader często napotyka się skróty, których nie ma w wykazie stosowanych skrótów, np.: FID, ECD, TMSD, PFPOH, RRF, TFAA, HFBI, TMSI, RQ i inne. Każdy z tych skrótów został w jakimś miejscu wytłumaczony, ale nie zawsze w tym, w którym znajduje się w danej chwili czytający.
2. Na str. 66 Doktorantka pisze o sześciu analizowanych hormonach estrogennych natomiast w innych częściach pracy widzę tylko pięć tego typu związków.
3. Czy na str. 70 (wiersz 3↓) nie powinno być „diflunisal" zamiast „diklofenak"?
4. Wydaje mi się, że miejsce Tabeli 18 (str. 75) jest w dyskusji wyników, a nie w części doświadczalnej. Nie charakteryzuje ona warunków pomiarowych tylko podaje wyniki analizy.
5. W części doświadczalnej poświęconej izolacji i wzbogacaniu farmaceutyków z próbek ciekłych brak jest informacji o sposobie derywatyzacji.
6. Określenie „metoda izolacji i wzbogacania" farmaceutyków wydaje mi się nietrafne. Według mnie jest to metoda izolacji wzbogaconych próbek.
7. Część doświadczalna poświęcona badaniu próbek środowiskowych (str. 83) jest opisana w sposób trochę lakoniczny. Po szczegóły techniczne Autorka odsyła stąd do dyskusji wyników.
8. Rys. 9 (str. 85) nie przedstawia mechanizmu metylowania kwasów karboksylowych za pomocą TMDS. Przedstawia on wymianę wodoru na deuter w TMDS i uwolnienie deuterowanego diazometanu z cząsteczki TMDS.
9. Niemożliwość utworzenia acylowej pochodnej 17α-etynyloestradiolu (str. 96) tłumaczy Doktorantka zawadą steryczną, którą stanowi grupa etynylowa. Ciekawe dlaczego ta grupa nie jest przeszkodą w trakcie trimetylosililowania 17α-etynyloestradiolu?
10. Generalnie widma mas dyskutowane przez p. Migowską są prezentowane razem z rysunkiem związku, ewentualną fragmentacją i podanymi stosunkami m/z. Szkoda, że Rys. 27-32 przedstawiają widma mas pozbawione tych informacji.
11. Na Rys. 40 jest pomyłka we wzorze związku.
12. Dlaczego wartość PNEC dla kwasu salicylowego (Tabela 36) nie jest stała i różni się między sobą nawet o dwa rzędy wielkości?

13. W spisie literatury Doktorantka wprowadziła niepotrzebne urozmaicenie. Polega ono na tym, że część skrótów czasopism jest podawana z kropkami, a druga część bez kropek.

Całościowy dorobek naukowy mgr Natalii Migowskiej obejmuje współautorstwo 5 publikacji z Listy Filadelfilskiej (3 z nich stanowią wspomniany materiał rozprawy), 2 artykułów w recenzowanym czasopiśmie polskim (*Camera Separatoria*), 15 posterów prezentowanych na konferencjach międzynarodowych oraz 15 posterów prezentowanych na konferencjach krajowych.

Wniosek końcowy

Podsumowując, p. Natalia Migowska zrealizowała obszerny i bardzo ciekawy projekt doktorski, który został w przystępny sposób opisany. Wykonana przez Doktorantkę praca wymagała dokładności i biegłości, zarówno w odniesieniu do prowadzonych syntez jak i analiz. Uzyskane wyniki są wartościowe i wnoszą istotny wkład w badania pozostałości NZPL oraz hormonów estrogennych w próbkach środowiskowych. O jakości prezentowanych w dysertacji wyników najlepiej świadczy fakt, że zostały one opublikowane w trzech bardzo dobrych, wymienionych wcześniej, czasopismach. W dwóch z tych publikacji p. Migowska jest pierwszym autorem. Przedstawione w recenzji uwagi w żaden sposób nie pomniejszają mojej bardzo wysokiej oceny rozprawy. Potwierdzają tylko, że pracę przeczytałam z zainteresowaniem. Dlatego, z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny dysertacja pt. „Opracowanie metod oznaczania wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz hormonów estrogennych w próbkach środowiskowych techniką chromatografii gazowej" spełnia wszelkie wymogi 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 Natalii Migowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Gdańsk, 17.01.2013r. Beata Liberek