



RECENZJA PRACY DOKTORSKIEJ
Pani mgr Anny LISIK
pt. „Rozwój i walidacja metod analitycznych w badaniach kinetyki uwalniania związków wapnia i żelaza”



UNIwersytet
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr farm. Anny Lisik została wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej, Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu. Promotorem pracy jest kierownik Katedry - prof. dr hab. Witold Musiał.

Wydział

Farmaceutyczny

Rozprawa doktorska ma formę zbioru 3 spójnych tematycznie prac oryginalnych, opublikowanych w latach 2018-2019 w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym ze współczynnikiem oddziaływania (IF), który sumarycznie wynosi 4.283 i odpowiada 70 pkt. MNiSW.

Katedra

Technologii

Postaci Leku

i Biofarmacji

We wszystkich pracach Pani mgr Anna Lisik jest pierwszym autorem. Oświadczenia współautorów wskazują na wiodący wkład (nie mniejszy niż 60%) Doktorantki w ich powstanie. Uzupełnienie rozprawy stanowią dwie publikacje oryginalne, opublikowane w anglojęzycznym czasopiśmie bez IF, 8 pkt. MNiSW, pt. *Current Issues in Pharmacy Medical Sciences*, które stanowiły podstawę otwarcia przewodu doktorskiego.

Głównym kierunkiem zainteresowań badawczych Pani mgr farm. Anny Lisik jest poszukiwanie nowych metod analizy ilościowej jonów wapnia i żelaza(II) pod kątem ich zastosowania w badaniach dostępności farmaceutycznej z półstałych lub stałych postaci leku, wg wytycznych farmakopealnych i *ICH Q2(R1) Validation of Analytical Procedures*.

W przedmiotowym cyklu, jedna publikacja dotyczy opracowania i walidacji metody ilościowego oznaczenia jonów wapnia, uwolnionego z półstałych preparatów hydrożelowych. Do realizacji celu badań, Doktorantka wybrała technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizy zostały wykonane dla ośmiu formułacji. We wszystkich preparatach wapń występował w formie soli o farmakopealnej nazwie wapnia dobezytan jednowodny. Nośnikiem dla substancji leczniczej był hydrożel przygotowany z metylocelulozy.

Należy podkreślić, że w badaniach uwalniania substancji leczniczej z hydrożeli zwłaszcza, tych które zawierają metylocelulozę, problemy analityczne może stwarzać duża lepkość układu, precypitacja polimeru pod wpływem rozpuszczalników organicznych lub zmiany temperatury, co w konsekwencji w znacznym stopniu utrudnia proces walidacji.

Z tego względu, osiągnięciem Pani mgr Anny Lisik jest opracowanie i walidacja nowej metody ilościowego oznaczania jonów wapnia uwolnionych z hydrożeli. Doktorantka potwierdziła przydatność systemu HPLC z detektorem UV-VIS do wykonywania takich analiz (RSD=1.12%). Metoda charakteryzowała się

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48(12) 62 05 600

fax: +48(12) 62 05 619

tpl@farmacja.cm-uj.krakow

liniowością, wykazaną dla 5 stężeń dobezylanu wapnia w zakresie od 60% do 140%. W odniesieniu do 100% poziomu stężenia substancji czynnej, odzysk wynosił 99-101%. Dokładność i precyzja metody były zgodne z wytycznymi ICH. Granica oznaczalności metody (LOQ) wynosiła 13.25 µg/mL. Na podstawie niskich wartości RSD, tj. <2%, metodę uznano za odporną na wpływ czynników środowiskowych, jak np. przechowywanie próbek w lodówce przez 72h, w temperaturze pokojowej przez 48h, czy kolejno zmiany temperatury kolumny chromatograficznej, pH fazy ruchomej, przepływu i zawartości rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej.

Z praktycznego punktu widzenia, ważny jest również krótki czas analizy, tj. 5 min, związany z uzyskaniem krótkich czasów retencji substancji czynnej (2.7-3.1 min) w zaproponowanych przez Doktorantkę warunkach oznaczenia.

W kolejnych dwóch artykułach oryginalnych z cyklu publikacyjnego, Kandydatka opisała rozwój i zastosowanie nowej metody ilościowego oznaczania jonów żelaza(II) w badaniach uwalniania. Rutynowo takie pomiary w próbkach farmaceutycznych wykonuje się metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej (AAS). Jednak zastosowanie metody AAS do oznaczania stężenia jonów żelaza uwolnionych ze stałych postaci leku może ograniczać, m.in. wieloskładnikowy charakter stałej matrycy, konieczność wielokrotnego rozcieńczania prób, lub częstej wymiany kuwety grafitowej, co skutkuje trudnościami w zagwarantowaniu precyzji metody i negatywnie wpływa na jej wydajność.

Nowatorskim rozwiązaniem tych problemów analitycznych jest opracowana przez Doktorantkę metoda konduktometryczna do ilościowej oceny stężenia jonów żelaza(II) *in-line* w badaniach uwalniania z doustnych form stałych, takich jak tabletki i kapsułki.

Do opracowania metody, Doktorantka wybrała cztery handlowe produkty lecznicze, tj. tabletki o niemodyfikowanym i zmodyfikowanym (przedłużonym) uwalnianiu oraz suplement diety w postaci kapsułek. Jony żelaza(II) występowały w formie dwóch soli, tj. żelaza(II) siarczan siedmiowodny, żelaza(II) glukonian dwuwodny, oraz chelatu żelaza(II) z glicyną. W zależności od produktu, deklarowana zawartość żelaza(II) mieściła się w zakresie od 23.2 mg do 105 mg. Co istotne, spośród analizowanych czterech produktów handlowych, trzy były preparatami złożonymi, które oprócz jonów żelaza(II) oraz niezbędnych substancji pomocniczych, zawierały dodatkowo co najmniej jedną substancję czynną, np. kwas askorbowy, foliowy, witaminę B₆ i B₁₂.

Należy tutaj podkreślić, że Doktorantka nie tylko sprawnie uporała się z trudnościami analitycznymi w układach wieloskładnikowych, ale również dokonując częściowej walidacji metody wykazała, że nowa metoda jest liniowa i precyzyjna w odniesieniu do trzech z czterech preparatów poddanych analizie, przy czym dwa z nich stanowiły produkty o przedłużonym uwalnianiu.

Interesującym elementem rozprawy doktorskiej, jest analiza porównawcza nowo opracowanej metody konduktometrycznej oraz atomowej spektroskopii absorpcyjnej do wyznaczenia stężenia jonów żelaza(II). Wartości RSD w metodzie konduktometrycznej były mniejsze (1.83-3.48%) niż w metodzie AAS (6.15-11.13%), co wskazuje na jej większą precyzję.

W ostatnim etapie prac, profile uwalniania substancji czynnych wyznaczone eksperymentalnie metodą konduktometryczną zostały użyte do oceny kinetyki uwalniania jonów żelaza(II) z trzech preparatów handlowych w oparciu o wybrane modele matematyczne, tj. zerowego i pierwszego rzędu, Hixson-Crowell i Korsmeyer-Peppas. Na podstawie wysokich wartości współczynnika korelacji, stwierdzono dobre dopasowanie modeli ($r^2 > 0.9408$) do profili uwalniania. Wartości czasu połowicznego uwalniania wynosiły od 12 do 90 min i odzwierciedlały duże różnice we właściwościach badanych formuacji.

Zakres prac badawczych opisanych w artykułach oryginalnych oraz interpretacja ich wyników nie wymaga dodatkowego komentarza, a ich opublikowanie na łamach czasopism z bazy JCR świadczy o wysokim poziomie badań.

Rozprawa doktorska zawiera również dokument (przewodnik), w którym Doktorantka opisuje w skrócie zakres i wyniki swoich badań, poprawnie przytaczając cytaty 37 prac naukowych opublikowanych w latach 1994-2019. Część teoretyczna, rozpoczyna się opisem zasadniczego celu pracy, po którym następuje krótkie wprowadzenie, obejmujące charakterystykę: farmakopealnych metod uwalniania, wybranych modeli matematycznych stosowanych do oceny kinetyki uwalniania, znaczenia walidacji w metodach analitycznych oraz trudności analitycznych związanych z analizą jonów wapnia i żelaza. Następnie Doktorantka opisuje najważniejsze materiały i metody użyte w pracy. W kolejnej części rozprawy znajduje się opis wybranych wyników badań zawartych w publikacjach wraz z dyskusją. Podsumowanie najważniejszych wyników, Doktorantka zawarła w dziewięciu wnioskach, z których wynika, że jest możliwe uproszczenie procedur analitycznych stosowanych w badaniach uwalniania jonów wapnia i żelaza(II). Dalej znajdują się streszczenia pracy w języku polskim i angielskim. Wersja angielska streszczenia jest spójna z wersją polską. Uzupełnienie rozprawy doktorskiej stanowi:

- lista publikacji własnych Doktorantki (2 jako podstawa otwarcia przewodu doktorskiego, 3 jako podstawa rozprawy doktorskiej, 1 praca dodatkowa – sumaryczny IF=4.684, 101 pkt. MNiSW),
- wykaz komunikatów zjazdowych (8 zaprezentowanych na konferencjach krajowych, 5 na konferencjach międzynarodowych)
- krótki życiorys Doktorantki,
- oświadczenia współautorów publikacji,
- kopie prac będących podstawą otwarcia przewodu doktorskiego i stanowiących podstawę pracy doktorskiej.

Do obowiązków recenzenta należy ocena pracy pod względem błędów stylistycznych, ortograficznych lub gramatycznych. Moja uwaga dotyczy nomenklatury związków chemicznych opisanych w rozprawie. Zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Unii Chemii Czystej i Stosowanej (ang. IUPAC) określenie „jony żelazawe” powinno być zastąpione przez „jony żelaza(II)”. Według FP XI nazwa kwasu askorbinowego to kwas askorbowy.

Na str. 11 Doktorantka pisze „atomowa spektrometria absorpcyjna jest techniką analityczną polegającą na pomiarze stężeń różnych pierwiastków na podstawie pomiaru *emisji* promieniowania elektromagnetycznego” powinno być „na podstawie pomiaru *absorpcji* promieniowania elektromagnetycznego”.

W tabeli 5 na str. 23 podane są wyniki SST dla jednego preparatu z dobezylanem wapnia w sześciu powtórzeniach, zamiast dla ośmiu analizowanych preparatów jak sugeruje odwołanie do tabeli w tekście oraz sam jej tytuł.

Na str. 35 pod tabelą 14, $t_{0,5}$ zdefiniowano jako „czas połowicznej przemiany”, zamiast „czas połowicznego uwalniania”.

Na str. 36 „udało się opracować metodę na ocenę” zamiast „udało się opracować metodę do oceny”.

Na str. 46 „tabletki o nieprzedłużonym uwalnianiu”, zamiast „tabletki o niemodyfikowanym uwalnianiu”.

Str. 47 jest „zastosowana” powinno być „zastosowania”.

Drobne uwagi wyszczególnione powyżej, wynikają z obowiązków recenzenta, ale w żaden sposób nie wpływają na całokształt mojej pozytywnej opinii na temat niniejszej rozprawy doktorskiej.

Ciekawym uzupełnieniem wyników zaprezentowanych w rozprawie, a zarazem zachętą do dyskusji naukowej byłyby odpowiedzi na następujące pytania:

- Deklarowana zawartość jonów żelaza w analizowanych preparatach wynosi od 23.2 mg do 105 mg. Czy preparaty różniły się wielkością i kształtem? Jaki to mogło mieć wpływ na kinetykę uwalniania?
- Jakie testy statystyczne można zaproponować do porównania wyników oznaczeń jonów żelaza(II) metodą konduktometryczną i absorpcyjnej spektrometrii atomowej?

Po zapoznaniu się z przedłożoną do oceny rozprawą doktorską uważam, że sposób zaplanowania pracy eksperymentalnej, dobór i umiejętne zastosowanie metod badawczych, sprawność w interpretacji wyników badań oraz świadomość ograniczeń metod analitycznych, bardzo dobrze świadczą o Kandydatce ubiegającej się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Podsumowanie

Stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Anny Lisik spełnia wymogi merytoryczne i formalne stawiane dysertacjom doktorskim określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (tekst jednolity Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 z późn. zm.) z uwzględnieniem art. 179 ust. 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669).

W mojej opinii, przedłożona do zaopiniowania praca doktorska obejmuje istotne zagadnienia badawcze o charakterze poznawczym i aplikacyjnym. Z pełnym przekonaniem przedkładam, Wysokiej Radzie Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Anny Lisik do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową rozprawy, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie opiniowanej pracy doktorskiej (załącznik 1).

Katedra Technologii Postaci Leku
Biofarmacji UJCM

dr hab. Anna Krupa
Adiunkt

Kraków, 26.07.2019

Kraków, 26.07.2019



UNIwersYTET
JAGIELLOŃSKI
COLLEGIUM
MEDICUM

Imię i nazwisko recenzenta: **dr hab. n. farm. Anna Krupa**

Imię i nazwisko doktoranta: **mgr n. farm. Anna Lisik**

Tytuł pracy doktorskiej: **„Rozwój i walidacja metod analitycznych w badaniach kinetyki uwalniania związków wapnia i żelaza”**

WNIOSEK O WYRÓŻNIENIE PRACY DOKTORSKIEJ

Wydział

Farmaceutyczny

Niniejszym zwracam się do Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu o wyróżnienie przedmiotowej rozprawy doktorskiej.

Katedra

Technologii

Postaci Leku

i Biofarmacji

Uzasadnienie:

Przedstawiona do recenzji praca doktorska stanowi cykl trzech spójnych tematycznie publikacji opublikowanych w czasopismach o zasięgu międzynarodowym z Impact Factor. Ich sumaryczny współczynnik oddziaływania $IF=4.283$ i odpowiada 70 pkt. MNiSW. We wszystkich pracach Doktorantka jest pierwszym autorem, a jej wiodący wkład w powstanie niniejszych publikacji nie budzi wątpliwości. Atutem rozprawy jest duża wartość aplikacyjna wyników badań, uzyskanych przy zastosowaniu niestandardowych, ale łatwo dostępnych narzędzi analitycznych.

Reasumując, w mojej opinii oceniana rozprawa spełnia warunki obowiązujące na Wydziale Farmaceutycznym z OAM Uniwersytetu Medycznego we Wrocławiu, dotyczące wyróżniania prac doktorskich.

Katedra Technologii Postaci Leku
i Biofarmacji UJCM


dr hab. Anna Krupa
Adiunkt

ul. Medyczna 9

PL 30-688 Kraków

tel. +48(12) 62 05 600

fax: +48(12) 62 05 619

tpl@farmacja.cm-uj.krakow