



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w
Poznaniu

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki

Adres: ul. Rokietnicka 3
60-806 Poznań
mkaraz@ump.edu.pl

tel. (61) 641-83-65

Poznań 2023-05-07

RECENZJA

pracy doktorskiej wykonanej przez mgr inż. Dawida Kucharskiego
pt: „Oznaczanie związków cynoorganicznych i substancji czynnych leków jako
zanieczyszczeń osadów dennych estuarium Odry”

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr inż. Dawida Kucharskiego wykonana pod kierunkiem dr hab. n. farm. Joanny Giebułtowicz oraz dr. Przemysława Drzewicza w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, dotycząca analizy związków cynoorganicznych i substancji czynnych leków w osadach dennych estuarium Odry, doskonale wpisuje się w niezwykle ważny nurt badań mających na celu ocenę stanu zanieczyszczenia środowiska naturalnego i jego potencjalnego wpływu na organizmy żywe. Jednocześnie, przedstawione badania zrealizowane zostały zgodnie z założeniami zielonej chemii analitycznej, których celem jest mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych a tym samym ograniczenie ich szkodliwego wpływu na środowisko.

Rozprawa doktorska liczy 47 numerowanych stron i zawiera streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów, teoretyczne wprowadzenie do badanej tematyki, jasno sprecyzowany cel pracy, opis materiałów i metod zastosowanych do jego realizacji, wyniki wraz z komentarzem, podsumowanie i główne osiągnięcia, wnioski, a także artykuły będące integralną częścią rozprawy. Wyniki przeprowadzonych przez mgr inż. Dawida Kucharskiego badań udokumentowano w pięciu spójnych tematycznie publikacjach, obejmujących rozdział w monografii oraz cztery prace oryginalne, opublikowane w latach 2020-2022 r. w międzynarodowych czasopismach (*Molecules*,

Science of The Total Environment, Chemosphere), posiadających wysokie współczynniki oddziaływania *Impact Factor* 4,412 – 10,754. Elementem łączącym wszystkie publikacje jest analiza zanieczyszczenia osadów pobranych z obszaru estuarium Odry substancjami czynnymi leków (PhACs) i organicznymi związkami cyny (OTCs) w celu oceny stanu zanieczyszczenia środowiska naturalnego w tym obszarze i określenia związanego z tym ryzyka środowiskowego. Do rozprawy dołączono oświadczenia Doktoranta oraz współautorów opublikowanych manuskryptów. Wynika z nich, że udział p. mgr inż. Dawida Kucharskiego w przygotowaniu tych prac był znaczący (30-45%) i obejmował aktywne uczestnictwo w prowadzeniu prac badawczych, opracowaniu i interpretacji wyników i przygotowaniu manuskryptów. Z przesłanych informacji wynika, że p. Dawid Kucharski może poszczycić się stosunkowo wysokim dorobkiem naukowym (całkowity IF = 33,448) oraz uczestnictwem w trzech międzynarodowych konferencjach naukowych.

W rozdziale pierwszym rozprawy, będącym teoretycznym wprowadzeniem w podjętą tematykę badań, Doktorant przedstawił położenie geograficzne i warunki przyrodnicze ujścia Odry, wskazał potencjalne źródła zanieczyszczenia ekosystemu wodnego substancjami czynnymi leków i organicznymi związkami cyny oraz zagrożenia wynikające z ich obecności dla organizmów wodnych i człowieka. Doktorant trafnie wykorzystał przedstawione powyżej zagadnienia teoretyczne do podkreślenia zasadności podjęcia badań przeprowadzonych w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej. Dokonał również przeglądu piśmiennictwa opisującego przeprowadzone dotychczas analizy środowiskowe dotyczące badanych związków, wskazując jednocześnie czynniki przemawiające za koniecznością rozszerzenia zakresu analizowanych substancji oraz obszaru zbierania próbek.

Cel pracy oraz szczegółowe zadania badawcze zostały jasno sprecyzowane w kolejnym rozdziale. Doktorant postawił sobie ambitne zadanie przeprowadzenia szeregu badań obejmujących opracowanie i walidację nowej metody oznaczania tributyllocyny (TBT) i trifenylocyny (TPhT) w osadach dennych z użyciem ekstrakcji QuEChERS oraz techniki LC-MS/MS, a następnie porównanie jej z metodą powszechnie stosowaną i opisaną w normie PN-EN ISO 23161. Nowo opracowana i zwalidowana metoda została wykorzystana do ilościowego oznaczenia związków organicznych cyny w osadach dennych pobranych z estuarium Odry, a oznaczone stężenie TBT skorelowane z właściwościami fizykochemicznymi osadów. Kolejnym zadaniem badawczym była analiza substancji czynnych leków w pobranym materiale oraz ocena szkodliwego oddziaływania badanych związków na środowisko. Część badań obejmujących zbieranie próbek osadów, analizę pierwiastków, oznaczenie całkowitego węgla organicznego i

analizę granulometryczną, została wykonana w innych jednostkach, co przy tak złożonym projekcie jest w pełni zrozumiałe.

Kolejny rozdział rozprawy doktorskiej zawiera omówienie metodyki badań stosowanej w poszczególnych etapach pracy z uwzględnieniem optymalizacji metod oznaczania badanych związków, wyznaczonych parametrów walidacyjnych, czy warunków chromatograficznych. Szczegółowo opisano metodykę przygotowania próbek do badań z zastosowaniem metody QuEChERS oraz sposób wyznaczenia współczynnika ryzyka środowiskowego. Rozdział ten podzielony jest na podrozdziały odwołujące się do poszczególnych publikacji. Zauważyłam tutaj pewną nieścisłość: podrozdział 6.3 przedstawiający metodykę porównania dwóch metod analitycznych odwołuje się w swoim tytule do publikacji P3, w rzeczywistości jest to publikacja P4. Ponadto, w podrozdziale 6.2 jednym z wyznaczonych parametrów walidacyjnych była dolna granica oznaczalności (LLOQ), natomiast w podrozdziale 6.3 granica oznaczalności LOQ. Proszę o wyjaśnienie różnicy między tymi dwoma parametrami.

W kolejnym rozdziale omówiono wyniki przeprowadzonych badań. Pierwsza praca ujęta w rozprawie doktorskiej to publikacja P1 dotycząca opracowania nowej metody oznaczania TBT i TPhT w osadach dennych w oparciu o zasady zielonej chemii analitycznej. W tym celu do ekstrakcji analitów z matrycy Doktorant zastosował metodę QuEChERS, która jest mniej czasochłonna i wymaga mniejszej ilości rozpuszczalników organicznych o niższej toksyczności w porównaniu do metod standardowo stosowanych do oznaczeń badanych substancji w osadach. Metoda ta została zoptymalizowana ze względu na skład soli, fazy wodnej i organicznej, rodzaj sorbentu stosowanego do oczyszczenia ekstraktu, czas ekstrakcji i technikę mieszania. Zoptymalizowaną metodę QuEChERS w połączeniu z techniką LC-MS/MS poddano walidacji zgodnie z wytycznymi EMA a następnie zastosowano do analizy badanych związków w osadach. Niewątpliwą zaletą przeprowadzonych badań, obok ich proekologicznego charakteru, było użycie certyfikowanego materiału odniesienia o znanej zawartości TBT i TPhT w celu sprawdzenia wiarygodności wyników uzyskanych nową metodą. Po przejrzaniu publikacji nasunęło mi się jedno pytanie na temat wydajności ekstrakcji TBT. Czy wartość 63,5% podana na str. 4 i 73,1% na str. 5 publikacji P1 zostały wyznaczone w tych samych warunkach, tzn. bez dodatkowego oczyszczania sorbentem? W przypadku TPhT wartości te są bardzo podobne i wynoszą odpowiednio 63,5% i 65,1%. Z czego może wynikać ta różnica dla TBT?

W publikacji P4 przedstawiono wyniki porównania opracowanej metody QuEChERS LC-MS/MS z metodą oznaczania związków organicznych cyny:

monobutylocyny, dibutylocyny, TBT i TPhT, opartą o normę ISO23161. Jednak, jak zauważył Doktorant, nowo opracowaną metodą nie udało się oznaczyć monobutylocyny i dibutylocyny ze względu na brak możliwości detekcji jonów macierzystych tych związków. Na podstawie zestawienia parametrów walidacyjnych obu metod oraz statystycznego porównania stężeń analitów oznaczonych w referencyjnych i rzeczywistych próbkach osadów stwierdzono, że badane metody są równoważne. W opisie porównania parametrów walidacyjnych obu metod zauważyłam drobną nieścisłość. Stwierdzono tutaj, że metoda QuEChERS LC-MS/MS charakteryzowała się wyższą wartością LOD dla TPhT wynoszącą 5,0 ng/g. Jednak, jak wynika z tabeli 3, wartość ta odnosi się do LLOQ, natomiast LOD dla tego związku wynosi 1,5 ng/g.

Nowoopracowana metoda została wykorzystana do badań opisanych w publikacji P5, które dotyczyły określenia poziomu zanieczyszczeń TBT i TPhT osadów dennych pobranych z obszaru estuarium Odry. Jednym z największych osiągnięć w tej pracy było wykazanie, że związek TBT, pomimo obowiązującego w UE od 2003 r. zakazu jego stosowania, jest nadal obecny w środowisku naturalnym. Ponadto, Doktorant zidentyfikował główne źródła zanieczyszczenia TBT, którymi są przemysł morski i stoczniowy oraz wykazał wysoki poziom tego związku w promieniu 5 km od tych punktów. Należy tutaj zauważyć, że do analizy danych wykorzystane zostały zaawansowane metody chemometryczne, takie jak analiza skupień, analiza czynnikowa, czy analiza głównych składowych, które podnoszą wartość merytoryczną uzyskanych wyników. Dodatkowo, o wysoce aplikacyjnym charakterze pracy świadczy dokonana przez Doktoranta ocena potencjalnego zagrożenia ekologicznego TBT w punktach poboru próbek.

Kolejną pracą o bardzo istotnym znaczeniu w aspekcie toksykologicznym jest publikacja P3, dotycząca oceny zawartości substancji czynnych leków w osadach dennych. Przeprowadzona analiza w kierunku 130 związków w próbkach pobranych z 70 stanowisk potwierdziła obecność 48 substancji czynnych w stężeniach powyżej LOQ. Doktorant zauważył, że najwięcej wykrytych substancji należało do grupy środków przeciwbakteryjnych, psychoanaleptycznych, psycholeptycznych i beta-blokerów. Zidentyfikował również główne źródła zanieczyszczeń, którymi były niedostatecznie oczyszczone ścieki z oczyszczalni ścieków aglomeracji szczecińskiej oraz zanieczyszczenia transportowane wraz z wodami Odry. Również w tej pracy dokonano oceny ryzyka środowiskowego PhACs, co pozwoliło wytypować obszary, w których występuje największe zagrożenie dla środowiska związane z obecnością analizowanych związków. Ponadto, co bardzo cenne, na podstawie wyznaczonego współczynnika ryzyka,

zidentyfikowano substancje czynne, które mogą stanowić największe zagrożenie dla organizmów wodnych i dla zdrowia człowieka. W opisie uzyskanych wyników na str. 37 zauważyłam, że Doktorant wielokrotnie odwołuje się do Rys. 3, podczas gdy w rzeczywistości jest to Rysunek 2.

W rozprawie doktorskiej ujęto również publikację P2, która jest rozdziałem monografii. Doktorant przedstawił w niej wyniki przeglądu piśmiennictwa dotyczącego metod analitycznych stosowanych do oznaczania mikrozanieczyszczeń występujących w osadach i glebach. Praca ta stanowi bogate kompendium wiedzy na temat różnorodnych technik pobierania próbek, warunków ich przechowywania, metod oczyszczania, izolacji badanych związków z matrycy stałej oraz metod analitycznych stosowanych do oznaczeń. Co bardzo cenne, powyższe informacje zostały usystematyzowane wg grup związków stanowiących zanieczyszczenia obecne w osadach i glebach. Szkoda, że publikacja ta nie została omówiona w rozprawie doktorskiej, razem z innymi pracami wchodzącymi w skład cyklu, ponieważ zebrane przez Autora dane literaturowe, i wyciągnięte na ich podstawie wnioski są bardzo interesujące i zwracają uwagę na złożony proces analizy związków stanowiących zanieczyszczenia osadów i gleb i konieczność jego kontroli na każdym etapie, od pobrania próbki do końcowego oznaczenia w niej stężeń substancji czynnych.

W przedstawionej do oceny rozprawie zamieszczono podsumowanie przeprowadzonych badań oraz wnioski, które wskazują na konieczność monitorowania osadów dennych jako rezerwuaru potencjalnie niebezpiecznych związków jakimi są substancje czynne leków oraz tributyllocyna w estuarium Odry. Zgadzam się tutaj ze stwierdzeniem Doktoranta, że szczególnym monitoringiem należy objąć jakość wód powierzchniowych na obszarach, gdzie zidentyfikowano związki o średnim i wysokim ryzyku środowiskowym, stanowiących duże zagrożenie dla organizmów żywych.

Do rozprawy dołączono bibliografię, obejmującą 52 pozycje, głównie w postaci publikacji zagranicznych z kilku ostatnich lat i źródeł internetowych, które w sposób wyczerpujący wyjaśniają podstawy teoretyczne podjętych badań. Zastosowane metody badawcze są nowoczesne i zostały trafnie dobrane do rodzaju zadań badawczych i wyznaczonego celu. Tabele i ryciny obrazujące wyniki badań przedstawione w publikacjach są niezwykle pomocne przy interpretacji prezentowanych danych.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska mgr inż. Dawida Kucharskiego jest ambitna i nowatorska, a zawarte w niej dane i sposób analizy świadczą o dużej wiedzy i umiejętnościach Doktoranta, nie tylko w zakresie prowadzenia badań analitycznych, ale także analizy uzyskanych wyników z użyciem zaawansowanych technik chemometrycznych. Objęte rozprawą prace oryginalne

dostarczają wielu wartościowych informacji dotyczących analizy zanieczyszczeń w osadach dennych estuarium Odry i ich ryzyka środowiskowego. Nie można też pominąć twórczego wkładu Doktoranta w rozwój nowoczesnych metod analitycznych z zastosowaniem przyjaznej dla środowiska techniki przygotowania próbek jako użytecznego narzędzia do oznaczania związków cynoorganicznych w matrycach stałych. W związku z tym, że rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668), wnioskuję o dopuszczenie mgr inż. Dawida Kucharskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, proponuję wyróżnić przedstawioną mi do oceny rozprawę doktorską ze względu na wysoki aplikacyjny charakter przeprowadzonych badań. O ich wartości świadczy również fakt, że zostały opublikowane w specjalistycznych czasopismach z bazy JCR o sumarycznym współczynniku oddziaływania $IF = 29,036$ i punktacji $MEiN = 620$.

Marta Karasiewicz-Zadę