



UNIwersytet w Białymstoku

Wydział Chemii



15-245 Białystok, ul. Ciołkowskiego 1K, ☎/ fax (+48-85) 738-8086; e-mail: pwalejko@uwb.edu.pl

Dr hab. Piotr Wałęjko  
Wydział Chemii  
Uniwersytet w Białymstoku  
ul. K. Ciołkowskiego 1K  
15-245 Białystok

Dział Obsługi Rady ds. Nauki i Doktorantów  
WPŁYNEŁO

29.08.2023

Białystok, 20.08.2023 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej magistra farmacji Jakuba Harwackiego  
„Zastosowanie spektroskopii  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR w identyfikacji leków sfalszowanych oraz analizie ilościowej API w tabletkach”**

W wielu opracowaniach poświęconych zjawisku rezonansu magnetycznego można znaleźć informacje, że zjawisko to odkryły niezależnie dwie grupy fizyków: E.M. Purcella z Uniwersytetu Harvarda, którzy w grudniu 1945 r. zarejestrowali widmo NMR parafiny (ciało stałe) oraz F. Blocha, z Uniwersytetu Stanforda, którzy to w styczniu 1946 r. uzyskali widmo wody (ciecz). Był to punkt wyjścia do dynamicznego rozwoju nowej gałęzi nauki, co potwierdziło przyznanie w 1952 roku F. Blochowi oraz E.M. Purcellowi Nagrody Nobla oraz w następnych latach kolejnym naukowcom wnoszącym istotny wkład w rozwój tej techniki. Obecnie spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (ang. *Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) wykorzystywana jest w różnych obszarach nauki, przemysłu oraz medycyny.

Pomimo, że pierwszych pomiarów NMR dokonano dla roztworów oraz ciał stałych, to jak wskazuje sam Autor, bardzo dynamicznie rozwijały się jedynie roztworowe techniki NMR. Wynika to głównie z bardziej złożonych interakcji pomiędzy jądrami atomowymi w fazie stałej, w porównaniu do fazy ciekłej (tzw. anizotropia przesunięcia chemicznego).

W przypadku pomiarów w roztworze rutynowe wykonywanie widm NMR możliwe było dopiero od 1995 r., kiedy to komercyjnie dostępne stały się spektrometry (200 – 600 MHz), oparte o magnesy nadprzewodzące. Od tego czasu do dnia dzisiejszego odnotowano ogromny przeskoc jakościowy i technologiczny w budowie spektrometrów NMR. Niestety postęp technologiczny powoduje, że współczesne spektrometry NMR, są coraz bardziej kosztownym sprzętem pomiarowym, co niewątpliwie hamuje upowszechnienie spektroskopii NMR np. w przemyśle farmaceutycznym. Natomiast niniejsza praca jest dobrym przykładem na to, że pomiary NMR w fazie stałej mogą być istotnym narzędziem w autentykacji produktów farmaceutycznych czy też analizie ilościowej API w produktach leczniczych. Tym bardziej, że obserwowany postęp techniczny w zakresie rejestracji widm ssNMR polegający na konstrukcji rotorów pozwalających na wirowanie próbki stałej pod kontem magicznym (MAS) oraz opracowanie sekwencji impulsów wykorzystującej polaryzację skrośną (CP) zapewne jest dopiero wstępem do opracowania rozwiązaniem pozwalającym na upowszechnienie spektroskopii NMR w fazie stałej.

W efekcie, jak podkreśla sam Autor do rejestracji widma NMR w roztworze, jak i w fazie stałej niezbędne stało się posiadanie kosztownego spektrometru wyposażonego w zestaw dość drogich sond pomiarowych. Tu chciałbym zwrócić uwagę, że nie każde laboratorium wykonujące pomiary NMR musi korzystać z kosztownego i drogiego w utrzymaniu urządzenia NMR. Być może sytuacja znacznie

się zmieni z rozwojem i upowszechnieniem tzw. spektrometrów Benchtop NMR. Już teraz urządzenia te dają dobre wyniki w zakresie pomiarów w roztworze, podczas gdy rutynowe pomiary w fazie stałej są raczej nieosiągalne. Jakkolwiek w dostępnej literaturze pojawiają się wzmianki o pomiarach solid-state w wykorzystaniu spektrometru Benchtop (10.1002/cphc.201800711). Pomimo ograniczeń z dostępem do spektrometrów ssNMR uważam, że tematyka dysertacji jest interesująca, gdyż wytycza nowe kierunki w wykorzystaniu spektroskopii NMR w fazie stałej nie tylko w zakresie autentykacji produktów, ale również w zakresie określania składu mieszanin, jak też ilościowego określania API np. w tabletkach.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska mgr farm. Jakuba Harwackiego „Zastosowanie spektroskopii  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR w identyfikacji leków sfałszowanych oraz analizie ilościowej API w tabletkach” została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej i Fizycznej Warszawskiego Uniwersytetu medycznego pod opieką dr hab. Dariusza Macieja Pisklaka oraz dr hab. Łukasza Szeleszczuka (promotor pomocniczy). Badania naukowe kierowane przez promotorów pracy skoncentrowane są na badaniu struktury związków chemicznych głównie za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego w roztworze jak, i w ciele stałym. Chciałbym podkreślić, że recenzowana praca dobrze wplata się w tematykę badawczą Zakładu oraz z powodzeniem wykorzystuje doświadczenie i wiedzę zdobyte przez Pracowników Zakładu w zakresie wykorzystania techniki ssNMR w identyfikacji zafałszowanych leków.

Rozprawę, którą stanowi 191 stron maszynopisu przygotowano w tradycyjnej formie w języku polskim. Składa się ona z trzech głównych części: części literaturowej (44 stron), części eksperymentalnej (109 stron) oraz części zawierającej podsumowania i wnioski (3 strony). W bibliografii (12 stron) zacytowano 111 pozycji literaturowych, a większość przywołanych w odnośnikach prac oryginalnych została opublikowana pod koniec poprzedniego stulecia lub w XXI wieku, co potwierdza aktualność tematyki dysertacji. Rozprawę uzupełniają streszczenie w języku polskim i angielskim, wykaz stosowanych skrótów oraz szczegółowy spis rycin.

Pod względem edytorskim praca została przygotowana w sposób staranny, jakkolwiek Autor nie uniknął drobnych niedociągnięć. Ponadto na podkreślenie zasługuje bardzo przejrzysta forma prezentacji pracy, co jest bardzo przydatne z punktu widzenia recenzenta. Co do poprawności językowej, to pracę napisano poprawnym językiem, a ilość „literówek” i błędów językowych jest naprawdę niewielka. Oczywiście Autor nie ustrzegła się całkowicie tego typu błędów, lub niejednoznaczności językowych, co jest zrozumiałe przy przygotowywaniu tak obszernego tekstu. Z obowiązków wynikających z roli recenzenta w końcowej części recenzji umieściłem przykłady takich uchybień.

Co do treści zawartych w części literaturowej uważam, że Autor dobrze je skomponował i dobrze powiązał z postawionymi przed sobą celami: oceną przydatności ssNMR w identyfikacji wybranych produktów zafałszowanych oraz użyteczności analizy ssNMR w analizie ilościowej stałych postaci wybranych leków. Z uwagi na to w pracy pojawiły się informacje na temat formulacji farmaceutycznej, metod ich analizy a następnie przestępczości farmaceutycznej z uwypukleniem zagrożeń dla zdrowia pacjenta i zdrowia publicznego. Całość dopełniają bieżące doniesienia na temat wykorzystania spektroskopii ssNMR w oznaczeniach ilościowych API w szeregu produktów farmaceutycznych.

W kolejnym podrozdziale Autor w dość przejrzysty sposób omawia teoretyczne podstawy spektroskopii NMR – podstawy teoretyczne zjawiska oraz sposób rejestracji widm NMR. Następnie Autor opisuje przyczyny utrudniające pomiary NMR w fazie stałej oraz przybliżył idee standardowo

stosowanych w tych pomiarach technik takich jak: wirowanie pod kontem magicznym (MAS), cross-polaryzacja (CP) oraz odsprężanie wysokiej mocy (HPD). Przedstawione w tej części pracy informacje są trafnie wyselekcjonowane i wystarczające czytelnikowi do zrozumienia problemów związanych z rejestracją widm NMR w fazie stałej. Z obowiązku recenzenta chciałbym jednak zamieścić pewną uwagę dotyczącą tego fragmentu pracy. Jak wspomniałem pomiary ssNMR wymagają posiadania dość kosztownej aparatury osiągalnej jedynie w niektórych ośrodkach naukowych, co może być dużą barierą dla upowszechnienia się tego typu pomiarów. Czy nie można było by w tej części pracy odnieść się do perspektyw związanych z wykorzystaniem Benchtop NMR w analizach farmaceutycznych w roztworze i fazie stałej?

W części eksperymentalnej Autor w obszerny sposób przedstawił swoje próby wykorzystania spektroskopii  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR w identyfikacji zafałszowanych produktów na przykładzie produktu Viagra firmy Pfizer oraz ilościowego oznaczania zawartości chlorowodoru propranololu z produktami leczniczymi. Chciałem podkreślić, że celem badań było sprawdzenie użyteczności spektroskopii ssNMR, co zostało wykazane, a dodatkowo uzyskane wyniki Autor z powodzeniem skorelował z ogólnie uznanymi metodami oznaczania chlorowodoru propranololu za pomocą spektroskopii UV-VIS. Na podstawie uzyskanych wyników Autor bezsprzecznie mógł potwierdzić osiągnięcie wstępnie założonych celów badawczych tj. wykazanie użyteczności spektroskopii ssNMR w analizie farmaceutycznej stałych postaci leków, zarówno w analizie jakościowej jak i ilościowej.

Z obowiązków wynikających z roli recenzenta poniżej umieściłem listę mniejszych i większych uchybień, które zauważyłem w pracy:

- 1) W spisie treści proponowałbym rozdzielić poszczególne części pracy poprzez numerację: 1 - część literaturowa, 2 - część eksperymentalna, 3 - podsumowanie a 4 - piśmiennictwo. Pozostałe podrozdziały należy konsekwentnie numerować w następujący sposób: 1.1; 1.1.1 itp.
- 2) W spisie treści, spisie rycin, tytułach podrozdziałów i w innych miejscach jest  $^{13}\text{C}$  zamiast  $^{13}\text{C}$ .
- 3) Mam wątpliwości, co do poprawności skrótu SS-NMR, wg (<http://bmr.io/education>) należy stosować zapis solid-state NMR (ssNMR)?
- 4) str. 25 czy od roku 2021 USP podał wytyczne dotyczące farmaceutycznego wykorzystania spektroskopii ssNMR?
- 5) brak wyjaśnienia niektórych skrótów np. API, RFS itp.
- 6) str. 33 jest „zmiany położenia sygnałów azotu w widmie” – czy chodzi o linie rezonansowe?
- 7) brak konsekwencji w zapisie symboli np. str. 57 we wzorze symbol  $\theta$  jest pisany kursywą a w tekście nie. Podobnie str. 59 symbole opisujące czas kontaktu czy czas relaksacji – uwaga dotyczy większości wzorów. Str. 111 symbole określające konfiguracje bezwzględna (*R/S*) również zapisujemy kursywą.
- 8) str. 75 Rycina 18 czy widma tabletek uzyskano z podobnych ilości masy tabletki a widmo cytrynianu sildenafilu z proporcjonalnej ilości wzorca?
- 9) str. 78 Rycina 20 czy w analizie porównawczej autentycznego produktu i tabletek zafałszowanych nie należało zastosować analizy chemometrycznej? Taki „odcisk palca” autentycznego produktu pozwalałby na automatyczną ocenę autentyczności tabletek?
- 10) str. Rycina 26 wzór jest przeogromny. Przygotowując ryciny (wzory związków) należy zadbać o to, aby długości wiązań, symbole itp. były jednakowe w każdym umieszczonym w pracy wzorze. Podobnie str. 102 i 109 specyficzny zapis soli amoniowej itp.

- 11) Czy opracowana metoda barwienia masy tabletkowej nie jest tanią prostą alternatywą dla kosztownych i czasochłonnych pomiarów ssNMR?
- 12) Rycina 33 niejednoznaczny opis przedstawionych na zdjęciu fiolek.
- 13) str. 100 sformułowanie „wykorzystano modelowy układ racemiczny chlorowoderek propranolol-laktoza” – czy chodzi o mieszaninę racemicznego chlorowodorku propranololu i laktozy
- 14) Str. 102-3 Czy Autor uwzględnił w obliczeniach błąd pomiaru masy? Na jakiej podstawie z dokładnością do szóstego miejsca wyznaczył ilość substancji w molach? Uważam, że przy zmierzonych wartościach powinno się pojawić np.: wartość błędu. Podobne uwagi mam, co do wartości podawanych na rycinach na stronach 132-36. Autor podaje jedynie bezwzględne wartości, co uważam za znaczące niedopatrzenie. Zastanawia mnie również dokładność, z jaką są odmierzane substancje aktywne na linii produkcyjnej? Czy jest to zawsze deklarowana wartość 10, 40 mg czy też dopuszczalny jest błąd rzędu 5-10%?
- 15) str. 107 i dalej - widma ssNMR we wzorcu sygnał 45-50 ppm jest dość wysoki a w „tabletkach” sygnał ten jest wyraźnie mniej intensywny. Jakie mogą być tego przyczyny?
- 16) str. 110 i dalej Autor poświęca dużo czasu i energii na wyjaśnienie zwielokrotnienia linii rezonansowych na widmie  $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR *R/S* chlorowodorku propranololu. Dlaczego nie wykonano pomiarów X-ray i widm ssNMR z tego samego kryształu? Wydaje się, że krystalizacja racemicznego chlorowodorku nie powinna nastęrczać trudności? Tak skorelowane pomiary dałyby bardziej jednoznaczne odpowiedzi.
- 17) Rycina 83, 85 87 pomocna byłaby w analizie widma obecność osi x z odpowiednimi wartościami.
- 18) Czy do procesów rozdrabniania twardych tabletek nie można było zastosować bardziej efektywnej metody rozdrabniania np. młyna kulowego, a w przypadku pomiarów UV, dlaczego próbek nie odwirowywano w celu oddzielenia nierozpuszczalnych pozostałości?

Chciałbym podkreślić, że przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Recenzowana rozprawa udowadnia, że mgr farm. Jakub Harwacki posiadał umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i krytycznej analizy wyników, a także szukania własnych rozwiązań problemów badawczych. Wyniki przedstawione w pracy niewątpliwie posiadają elementy nowości naukowej i zostały umieszczone w dwóch pracach. Jednej wydanej w „*International Journal of Pharmaceutics*” (2023) i drugiej opublikowanej w „*Lek w Polsce*”, (2017). Należy podkreślić, że w obu pracach Doktorant był pierwszym autorem. Ponadto Doktorant jest jeszcze współautorem jednej publikacji dotyczącej porównania wykorzystania metod takich jak NMR, FT-IR, PXRD w analizie stałych postaci leków o niskim stężeniu (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (2018) oraz o (nie)wiedzy o witaminie C „*Lek w Polsce*”, 6-7/2016. Doktorant prezentował także rezultaty swoich badań na czterech konferencjach wiązanych z tematyką przedstawionej dysertacji.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymagania zwyczajowe i wymogi obowiązującej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym, a przedstawione uwagi nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy. Z pełnym przekonaniem składam do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych wnioski o dopuszczenie mgr farm. Jakuba Harwackiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rok Walejko