

Prof. dr hab. Wojciech Kamysz  
Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej  
Wydział Farmaceutyczny  
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 16.11.2022 r.

### RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

pt. „Otrzymywanie i analiza nowych form cytrynianu sildenafilu”,

wykonanej przez Panią mgr farm. Ewę Jurczak

Pani mgr Ewa Jurczak swoją pracę doktorską zatytułowaną „Otrzymywanie i analiza nowych form cytrynianu sildenafilu” wykonywała w Zakładzie Chemii Fizycznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem Pana dr. hab. n. farm. Łukasza Szeleszczuka oraz dr n. farm. Moniki Zielińskiej-Pisklak w roli promotora pomocniczego. Przedmiotem rozprawy było opracowanie metody otrzymywania nowych form cytrynianu sildenafilu oraz analiza struktury uzyskanej formy w oparciu o analizy DSC, TG, IR, ssNMR, PXRD, mikroskopii elektronowej, a także próby badania uwalniania API z tabletek z różnych form przygotowanych w ramach tej dysertacji.

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska liczy 193 stron i składa się z następujących rozdziałów: „Wstęp” (2 strony), „Cel pracy” (2 strony), „Sildenafil” (13 stron), „Metody badawcze” (22 strony), „Materiał do badań oraz zastosowane metody badawcze” (20 stron), „Wyniki i dyskusja” (112 stron), „Podsumowanie i wnioski” (3 strony), „Piśmiennictwo” (139 pozycji). Ponadto praca zawiera wykaz stosowanych skrótów i oznaczeń. Układ pracy jest klasyczny i nie budzi większych zastrzeżeń, brak jednakże jest streszczenia zarówno w języku polskim oraz angielskim. Praca jest bardzo obszerna, aż 193 strony, dodatkowo zastosowano w niej bogaty warsztat badawczy dlatego uważam, że takie streszczenie byłoby pomocne. W pierwszym z rozdziałów zatytułowanym „Wstęp” Autorka przedstawia kilka podstawowych informacji dotyczących sildenafilu, jego zastosowania w medycynie oraz ograniczenia i wady stosowania tej API. Wyjaśniła także motywację do podjęcia się badań nad nowymi formami tej substancji aktywnej o potencjalnie lepszej

biodostępności. W kolejnym rozdziale zatytułowanym „Cel pracy”, przedstawiony został bardzo szczegółowo plan badawczy z uwzględnieniem przygotowania nowych form sildenafilu oraz analizy uzyskanych form w oparciu o metody fizykochemiczne takie jak: termogravimetria (TG), skaningowa kalorymetria różnicowa (DSC), skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM), spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego w fazie stałej (ssNMR), dyfraktometrię proszkową (PXRD), spektroskopię IR oraz Rammana. Całość wzbogacona o metody *in silico* mające pomóc w analizie uzyskanych wyników, w szczególności PXRD oraz ssNMR. W następnym rozdziale zatytułowany „Sildenafil” przedstawione zostały informacje dotyczące budowy oraz metod otrzymywania tytułowej substancji aktywnej, a w szczególności formy cytrynianu. Omówiono zostało wykorzystanie cytrynianu sildenafilu w farmakoterapii, w leczeniu zaburzeń erekcji oraz nadciśnienia płucnego, a także doniesienia literaturowe o możliwych innych zastosowaniach m.in. w leczeniu cukrzycy typu 2 czy chorobach nowotworowych. Rozdział nr 4 „Metody badawcze” opisuje podstawy teoretyczne metod badawczy stosowanych przez autorkę. Rozdział ten jest dość zaskakujący i delikatnie odbiega od klasycznego układu rozpraw doktorskich w pracach eksperymentalnych, tytuł wskazuje, że zostaną tu przedstawione informacje dotyczące szczegółów metod oraz aparatury zastosowanej w pracy. Generalnie można by zaliczyć ten rozdział do swego rodzaju wstępu teoretycznego, jednak pewne zastrzeżenie budzi obszerność tego rozdziału liczącego aż 22 strony, co w porównaniu z bardziej istotnymi fragmentem dotyczącym „Sildenafilu” (13 stron) wydaje się niekonieczne. Dopiero w kolejnym z rozdziałów: „Materiał do badań oraz zastosowane metody badawcze” przedstawiono informacje dotyczące stosowanej aparatury oraz metody przygotowaniu nowych form sildenafilu w oparciu o suszenie oraz liofilizację. Najobszerniejszy z rozdziałów zatytułowany „Wyniki i dyskusja” przedstawia omówienie wyników dla uzyskanych form sildenafilu. Autorka postanowiła uzyskać nowe „bezwodne” postacie cytrynianu sildenafilu. Pierwszą z nich uzyskała poprzez suszenie w temperaturze 150°C przez 2 h, natomiast dwie pozostałe poprzez liofilizację roztworów wodnych zamrożonych w różnych warunkach (ciekłego azotu oraz zamrażarki). Następnie przeprowadzone zostały eksperymenty DSC, TG oraz IR, na podstawie których autorka stara się udowodnić usunięcie wody krystalizacyjnej. W tej części pojawiają się pewne pytania, które wymagają wyjaśnienia. Po pierwsze widma IR dla hydratu cytrynianu

sildenafilu oraz otrzymanego przez Panią Magister „bezwodnego” cytrynianu sildenafilu są niemal identyczne, w szczególności w zakresie, w którym widoczne są sygnały od grup O-H ( $3600\text{ cm}^{-1}$ ) i trudno się tu dopatrzeć usunięcia cząsteczki wody. Dodatkowo w obu przypadku próbek powstałych w wyniku liofilizacji we wspomnianym zakresie wyraźnie widać rozciągnięte sygnały pochodzące od wody. Autorka tłumaczy to higroskopijnością KBr, jednakże w takim wypadku warto by było wykonać analizy samej pastylki KBr rozcieranej w analogicznych warunkach, aby potwierdzić obecność wody w KBr. Czy takie analizy zostały wykonane?

Kolejnym elementem, który miał potwierdzić usunięcie wody były analizy TG. W przypadku komercyjnie dostępnego sildenafilu oznaczonego jako „uwodniony” omówiony został ubytek masy równy około 2,5%, natomiast w przypadku „bezwodnej” formy takiego omówienia brak, przez co nie określono też stopnia uwodnienia. Z kolei analiza wykresów oraz Tabeli 16. z wynikami wskazuje, że taki ubytek nastąpił. W Tabeli 16. przedstawiona została informacja dotycząca temperatury, w której doszło do ubytku 2% masy i w obu przypadkach jest ona zbliżona odpowiednio 190 i 193°C. Co wskazuje na podobne zachowanie obydwu form i obecność wody także w próbce oznaczonej jako „bezwodna”. Autorka wskazuje, że usunięcie wody następuje do temperatury około 192°C natomiast powyżej tej temperatury dochodzi do usunięcia cząsteczki kwasu cytrynowego, co zgodne jest z doniesieniami literaturowymi. Dodatkowo komentarza wymagają wyniki dla form zliofilizowanych. Widoczne są duże zmiany masy do 192°C oraz w przypadku jednej z nich na wykresach obserwujemy wzrost masy powyżej 100% oraz całkowity 100% rozkład. Nasuwa się pytanie, jak to możliwe i z czego wynika. Dodatkowo czy analizy były wykonywane jednokrotnie, czy powtarzane i za każdym razem obserwowano takie wyniki?

Z analiz DSC Pani Magister wyciąga podobne wnioski, jak w przypadku analiz TG, jednakże dodatkowego komentarza wymagają przestygnięcia pików endotermicznych do temperatur w zakresie 145-165°C. Co może być przyczyną takiej obserwacji? Czy jest to np.: woda występująca po procesie liofilizacji obniżająca temperatury topnienia i powodująca rozpuszczanie substancji w jej wodzie krystalizacyjnej i zaadsorbowanej? Obecność wody w liofilizatach jest zjawiskiem dość powszechnym, poza wodą krystalizacyjną może ona także występować w formie zaadsorbowanej. Podobnie jak w przypadku analiz TG –

czy były one powtarzane? Podsumowując, w tym fragmencie pracy wydaje się nieuzasadnione opisywanie wspomnianych form jako „bezwodne”, przynajmniej opisane w pracy wyniki nie wskazują na to jednoznacznie. Czy wykonywane były inne oznaczenia zawartości wody poza wspomnianymi jak np. zastosowanie metody Karla Fischera? Trudno także jest na podstawie tych wyników stwierdzić czy „bezwodny” cytrynian sildenafilu jest substancją bardzo higroskopijną i ta właściwość uniemożliwia jego dokładną charakterystykę, i czy w takim wypadku tak uzyskana bezwodna forma miała by znaczenie w formulacji ze względu na niską „trwałość” w swojej bezwodnej postaci.

W dalszej części pracy przedstawione zostały bardzo ciekawe wyniki dotyczące badania struktury oraz morfologii uzyskanych form w oparciu ssNMR, PXRD czy SEM. W tym miejscu należy podkreślić bardzo dobry opis zastosowanych metod oraz interpretację uzyskanych wyników. Autorka potwierdziła różną strukturę uzyskanych form, określiła ich krystaliczność w oparciu PXRD oraz porównała te wyniki z wynikami dostępnymi w literaturze. W oparciu o SEM oraz analizę stopnia krystaliczności wynikająca z analiz rentgenostrukturalnych z całą pewnością stwierdzić można amorficzność form uzyskanych w wyniku liofilizacji. Następnie Autorka podjęła się trudnej analizy w oparciu o  $^{13}\text{C}$  ssNMR oraz przypisania sygnałów na widmach. Dodatkowo prace te wspomagane były metodami obliczeniowymi. Na podkreślenie zasługuje fakt uzyskania nowych form amorficznych oraz bogaty wachlarz metod stosowanych przez Autorkę, a także dobra interpretacja uzyskanych wyników.

Ważnym aspektem opisanych badań była podjęta próba badania uwalniania API w różnych form cytrynianu sildenafilu. Niestety, trudności na etapie przygotowania tabletek powodowały małą liczbę wykonanych prób. Powoduje to sporą niepewność w wynikach, zauważalne są duże odchylenia standardowe w przypadku tabletek uzyskanych z procesu liofilizacji o strukturze amorficznej. Pewnym mankamentem może być brak zaprezentowanych odchyleń standardowych na wykresie pokazującym profile uwalniania. Z lektury niniejszego fragmentu nasuwa się pytanie: w jakim zakresie badana była liniowość metody ponieważ, najwyższe z możliwych stężeń tj. 40 ppm jest blisko ostatniego punktu z krzywej 48 ppm.

Od strony edycyjnej praca napisana jest starannie, bogata jest w liczne wykresy oraz tabele, jednakże Autorka nie ustrzegła się błędów. Jedną z sporych wad pracy jest niezrozumiałe w mojej ocenie, zastosowanie bardzo grubego papieru, co czyni wydruk

ciężkim, ogranicza możliwość przekładania stron oraz znacząco utrudnia lekturę pracy. Dodatkowo taki wydruk wydaje się nieuzasadniony ze względów ekologicznych. Poza tą generalną uwagę w pracy zauważalne są niezbyt liczne błędy językowe oraz edycyjne np.:

- strony 51-52 – stosowanie zamienne stopni Celsjusza i Kelwinów, co wprowadza pewien chaos;
- strona 53 – niedopracowana tabela nr 5;
- strona 66 – stosowanie określenia „analityczna długość fali”;
- strona 75 oraz 155 – błędna numeracja odnośników literaturowych w podpisach rycin;
- strona 153 – brak poprawnego objaśniania, co do liter stosowanych w oznaczeniach na rycinach.

Niniejsza praca autorstwa Pani Magister Ewy Jurczak dotyka bardzo ważnego tematu związanego z badaniami nad właściwościami różnych form substancji aktywnych w preparatach leczniczych oraz ich biodostępnością wynikająca z formy oraz struktury krystalicznej bądź charakteru amorficznego. Praca została przygotowana w sposób poprawny i podkreśla umiejętności oraz bogaty warsztat Autorki. Niemniej jednak wydaje się, że używanie określenia „bezwodny” co do uzyskanych form jest nieuzasadnione i powinno to zostać zrewidowane. Warte uwagi jest uzyskanie form amorficznych cytrynianu sildenafilu oraz analizy strukturalne tych pochodnych. Podkreślić należy szeroki warsztat badawczy autorki oraz duże zaangażowanie w interpretację niełatwych analiz.

Stwierdzam, że przedłożona do recenzji dysertacja Pani Magister Ewy Jurczak pt. „Otrzymywanie i analiza nowych form cytrynianu sildenafilu” spełnia wszystkie wymogi merytoryczne i formalne stawiane rozprawom 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. 1 i 2 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.). W związku z tym, wnoszę do Rady Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr n. farm. Ewy Jurczak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

**KIEROWNIK**  
Katedry i Zakładu Chemii Nieorganicznej

  
prof. dr hab. Wojciech Kamysz