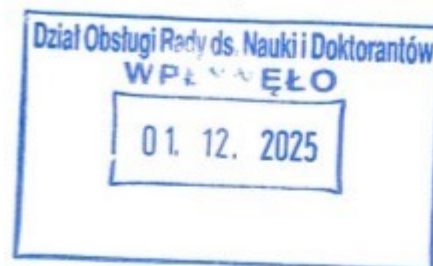


Prof. dr hab. Tomasz Grabowski
Gdański Uniwersytet Medyczny
Wydział Farmaceutyczny
ul. Generała Józefa Hallera 107
80-416 Gdańsk

Gdańsk, 25.11.2025 r.



Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej pt.:

„Analiza związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin”

*Recenzję opracowano w nawiązaniu do treści Uchwały Rady Dyscypliny Nauk
Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego z dnia 15.10.2025*

W prezentowanej dysertacji analizie poddano problematykę optymalizacji metod analitycznych, kwestie optymalizacji wykrywania oraz kontroli, aktywnych substancji azotoorganicznych. Obecne doświadczenia wskazują na to, że niskocząsteczkowe N-nitrozoaminy mogą stanowić zanieczyszczenia produktów leczniczych ale jak wskazała jasno Autorka dysertacji, nitrozowaniu mogą ulegać również substancje czynne, zaawansowane produkty pośrednie oraz produkty degradacji zawierające aminy drugorzędowe w swojej strukturze. Podstawę rozprawy doktorskiej stanowi ciąg czterech powiązanych ze sobą tematycznie publikacji naukowych.

Liczba publikacji zawierających słowo kluczowe nitrozoamina indeksowanych przez NCBI od blisko 50 lat utrzymuje się na poziomie około 300 nowych publikacji rocznie. Potrzeba implementowania nowych rozwiązań oraz poszerzania wiedzy w zakresie związanym ze związkami azotoorganicznymi to trend utrzymujący się od lat. Wynika między innymi z rosnącej świadomości zagrożeń jakie związki te mogą stanowić dla człowieka innych organizmów żywych oraz środowiska. Jednocześnie wiele agencji regulacyjnych zarówno na poziomie narodowym jak i ponadnarodowym wprowadza regulacje, wytyczne oraz obostrzenia związane z potencjalną obecnością tego typu związków zarówno w środowisku jak i lekach czy żywności. Świadomość zagrożeń oraz korzyści z umiejętnej kontroli oraz analizy

ryzyk w tym zakresie indukują prace związane z optymalizacją odpowiednich metod analitycznych. Niektóre ze źródeł podają że, nitrozoaminy rocznie mogą być przyczyną nawet 40 przypadków chorób nowotworowych / 1 milion mieszkańców UE. Oznacza to, że tylko w UE aż 18 tys. przypadków chorób nowotworowych rocznie może być indukowane kancerogenem jakim są nitrozoaminy. Jest to potencjalnie „tylko” około 0.5% wszystkich nowych przypadków chorób nowotworowych rocznie w UE. Jednocześnie jest to potencjalnie aż 18 tys. pacjentów borykających się często ze śmiertelnym zagrożeniem.

Biorąc pod uwagę powyższe, wybór tematyki rozprawy doktorskiej obejmującej analizę związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin, uważam za uzasadniony. Podjęte przez Doktorantkę zadania badawcze są aktualne i doskonale nawiązują do obecnych trendów oraz potrzeb.

Oceniana praca ma 130 stron, w tym kompletny tekst czterech publikacji, które stanowiły podstawę dysertacji. W rozprawie znajdują się wszystkie niezbędne elementy w tym strona tytułowa, spis treści, wykaz skrótów, wykaz publikacji stanowiących podstawę rozprawy, wykaz doniesień zjazdowych, streszczenie w języku angielskim oraz polskim, wprowadzenie, cel i założenia pracy, kompletne wydruki publikacji stanowiących podstawę dysertacji, podsumowanie, wnioski oraz oświadczenia współautorów.

Spis treści zawiera wszystkie niezbędne informacje i pozwala na odnalezienie wszystkich elementów rozprawy. Wykaz skrótów i symboli obejmuje najważniejsze skróty, symbole i spełnia swoją rolę. Pozostałe skróty Autorka objaśnia przy pierwszym zastosowaniu w tekście. Rozdział zawierający streszczenia w języku polskim oraz angielskim, w syntetyczny sposób odzwierciedla treść rozprawy. Streszczenie w języku angielskim jest wiernym tłumaczeniem tekstu polskiego. Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej zawiera cztery publikacje reprezentujące powiązany ze sobą ciąg tematyczny.

Należy podkreślić to, że w przypadku aż trzech IF każdej z nich ma wartość powyżej 4 co samo w sobie stanowi o jakości zaproponowanej tematyki. Doktorantka w czterech zaprezentowanych publikacjach osiągnęła sumaryczny $IF > 15$. Jest autorem, korespondencyjnym jednej z cyklu czterech wymienionych wyżej publikacji.

Wstęp napisano przejrzysto, stosując fachowy precyzyjny język. Na uwagę zasługuje to, że doktorantka śmiało i z doskonałym skutkiem posługuje się w nim wieloma schematami grafikami i zestawieniami. Elementy te ułatwiają zrozumienie tematyki którą rozwijała w swojej racji badawczej. Zachęcają również do dalszej lektury. Słowa wstępu oraz wiele wątków

które rozwinęła Autorka ilustruje jej zaangażowanie i szerokie spojrzenie na poruszane tematy. W piśmiennictwie dołączonym do treści wstępu znajduje się aż 11 różnych źródeł o charakterze regulacji. Fakt ten potwierdza że, Doktorantka potrafi poruszać się w skomplikowanym środowisku regulacji i wymogów pomiędzy różnymi obszarami wpływu poszczególnych agencji choćby takich jak EMA czy FDA. Umiejętność korzystania z piśmiennictwa fachowego i łączenia go z tzw. środowiskiem regulatorowym doskonale spleta się z wdrożeniowym charakterem rozprawy.

W sekcji „założenia i cel pracy” określono cel główny oraz kluczowe etapy realizacji prac badawczych. W streszczeniu określono cel prowadzonych badań jako: „przeprowadzenie analizy ryzyka powstawania N-nitrozoamin, opracowanie sposobu przygotowania próbek oraz innowacyjnych metod chromatograficznych oznaczania N-nitrozoamin i/lub związków azotoorganicznych, walidacja opracowanych metod chromatograficznych, zbadanie mechanizmów powstawania wybranych N-nitrozoamin oraz synteza nowych związków azotoorganicznych.”

W dalszej części pracy cel opisano jako :

„opracowanie innowacyjnych metod chromatograficznych oznaczania nitrozoamin / związków azotoorganicznych w API / produktach leczniczych, które będą wdrożone w Łukasiewicz-Institut Chemii Przemysłowej (Łukasiewicz-IChP), Narodowym Instytucie Leków (NIL) i/lub EDQM, a także będą stanowiły know-how wprowadzone do oferty usługowej Łukasiewicz-IChP oraz NIL”

Przytoczone fragmenty różnią się nieco w treści prowadząc jednak do tych samych celów głównych odpowiadających tytułom poszczególnych publikacji stanowiących podstawę dysertacji oraz jej tytułowi. W przypadku rozprawy doktorskiej zapisy te powinny być ujednolicone. Nie pozostawiają jednak wątpliwości co do tego jaki był cel prowadzonych badań. W sekcji tej przywołano również informację o tym jakie cele szczegółowe realizowano i opublikowano w poszczególnych publikacjach (1-4) z uwzględnieniem informacji o odpowiadających im doniesieniach zjazdowych.

Słowa wstępu napisano przejrzystie, rzeczowo z użyciem fachowego języka oraz z dbałością o szczegóły i styl. Zagadnienia poruszane w rozprawie poparto prawidłowo dobranym piśmiennictwem które koresponduje we właściwy sposób z tematem dysertacji oraz celami szczegółowymi. Zakres ciągu czterech publikacji świadczy, o bardzo dobrym

przygotowaniu merytorycznym Doktorantki. Sumaryczna liczba źródeł przytoczonych w czterech publikacjach stanowiących podstawę dysertacji wynosi aż 188.

W pracy zrezygnowano z sumarycznego opisu stosowanych metod. Stanowią one treść włączonych do rozprawy czterech publikacji – jednej przeglądowej oraz trzech oryginalnych. W sekcji Podsumowanie i wnioski w syntetyczny sposób podsumowano przeprowadzone prace. Skonkludowano również efekty prowadzonych prac. Wśród nich między innymi to, że opracowano nową metodę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) z użyciem mikroekstrakcji. Przy czym opracowana metoda pozwala na jednoczesne oznaczanie dziewięciu kancerogennych N-nitrozoamin w cilostazolu, sunitynibie i olmesartanie medoksomilu. Metodę poddano drobiazgowej walidacji co między innymi umożliwia stosowanie jej w rutynowej kontroli jakości API w środowisku GMP.

Opracowano również metodę LC-MS/MS umożliwiającą oznaczanie 1-metylo-4-nitrozopiperyzyny (MNP) w złożonych preparatach z ryfampicyną. Podobnie jak w poprzednim przypadku opracowana metoda została poddana drobiazgowej walidacji zgodnie z wytycznymi ICH. W trakcie badań stabilności i badań stresowych wykazano jednocześnie że MNP powstaje zarówno poprzez utlenianie 1-amino-4-metylopiperyzyny, jak i w wyniku rozkładu ryfampicyny w warunkach stresu oksydacyjnego i termicznego. W związku z tym zaproponowano również mechanizm powstawania MNP w oparciu o hydrolizę hydrazonu i dalsze utlenianie produktów degradacji ryfampicyny.

Wreszcie wykonano badania nad stabilnością wybranych API zawierających grupę hydrazonową, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów ich utleniania i redukcji. Przebadano cztery substancje czynne: dantrolen, nitrofurantoinę, furazydynę i nitrofural, wykazując ich znaczną elektroaktywność i tendencję do tworzenia potencjalnie niebezpiecznych produktów degradacji. W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano siedem produktów utleniania i dziesięć produktów redukcji. Co istotne zidentyfikowano nowe zanieczyszczenia nieopisane dotychczas w piśmiennictwie. Potwierdzono w kontekście badanych substancji że, połączenie elektrochemii z wysokorozdzielczą spektrometrią mas może być praktycznym narzędziem pozwalającym na ocenę stabilności związków chemicznych. Może również służyć wykrywaniu nowych zanieczyszczeń oraz wspomagać proces określania ich struktury.

Pod koniec rozdziału doktorantka przedstawiła dodatkowo dokumenty potwierdzające wdrożenie wymienionych wyżej metod. W dalszej części dołączono oświadczenia

współautorów publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej. W tym kontekście nie jest konieczne aby doktorantka sama sobie udzielała pozwolenie na wykorzystanie publikacji której jest pierwszym autorem, do wykorzystania jej w rozprawie doktorskiej której jest również pierwszym i w dodatku jedynym autorem (strona 104).

Konkluzje obejmują szerokie spektrum prac optymalizacyjnych, związanych z optymalizacją metod analitycznych w połączeniu z metodami służącymi *de facto* predykcji potencjalnych zagrożeń. Bezsprzecznie podkreślają osiągnięcie zarówno celów naukowych jak i wdrożeniowych.

W pierwszej z zaprezentowanych publikacji przeprowadzono przegląd literaturowy dotyczący rozpoznania mechanizmów powstawania nitrozoamin w różnych matrycach, takich jak próbki biologiczne, wody powierzchniowe i pitne, kosmetyki, substancje czynne lub produkty farmaceutyczne oraz kryteria ich oznaczania na bardzo niskich poziomach stężeń. Publikacja jest rzeczywiście doskonałym kompendium wiedzy napisanym z rozmachem i swobodą. Na uwagę zasługuje wiele zestawień i tabel które są niezwykle użyteczne dla czytelnika i pozwalają również na własną interpretację zebranych danych. Kluczowa konkluzja obecna w publikacji dotyczy nie tylko kwestii ich identyfikacji w zróżnicowanych matrycach. Dotyka również kwestii predykcji zagrożeń a w tym metod identyfikacji mechanizmów powstawania nitrozoamin.

W drugiej z zaprezentowanych publikacji przeprowadzono optymalizację i walidację nowej metody. W efekcie uzyskano, metodę analityczną wysokiej czułości do analitycznych badań przesiewowych obejmującą mikroekstrakcję. Zaproponowana metoda jest szybka, prosta, przyjazna dla środowiska i charakteryzuje się granicami oznaczalności zbliżonymi do metod wieloetapowych z ekstrakcją SPME lub SPE. Co więcej, zastosowano GC-MS które gwarantuje niskie koszty operacyjne i jest powszechnie stosowana do analizy lotnych zanieczyszczeń w substancjach farmaceutycznych. Nowatorskie podejście pozwoliło w efekcie zwalidować metodę zgodnie z wytycznymi ICH. Metoda pozwala na jednoczesne oznaczanie dziewięciu rakotwórczych nitrozoamin (NDMA, NMEA, NDEA, NDBA, NMOR, NPYR, NPIP, NDPA i N-metylo-npz) w takich substancjach aktywnych jak cilostazol, jabłczan sunitynibu i olmesartan medoksomilu.

W trzeciej publikacji przedstawiono zakres prac optymalizacyjnych w odniesieniu do metody która, może być zastosowana do bardziej złożonych matryc niż sama ryfampicina. Pozwala ona między innymi na analizę złożonych formułacji farmaceutycznych, takich jak tabletki zawierające ryfampicinę, izoniazyd, pirazynamid i chlorowodorek etambutolu. Zastosowanie zaprezentowanego podejścia pozwala również na stwierdzenie czy ryzyko obecności i oznaczania 1-metylo-4-nitrozo-piperazyny (MNP) powinno być brane pod uwagę tylko w przypadku gotowych produktów zawierających ryfampicinę. W konkluzji Autorka potwierdza, że konieczne jest monitorowanie i opisywanie produktów degradacji oraz mechanizmów degradacji API, w tym nitrozoamin, powstających podczas różnego typu badań stabilnościowych w szczególności w produktach wieloskładnikowych. Opracowana metoda została z powodzeniem zastosowana do analizy produktów ryfampicyny pochodzących z różnych źródeł. Badanie potwierdziło obecność różnych poziomów MNP w postaci zarówno zanieczyszczenia ze szlaku syntezy ale również jako produktu degradacji ryfampicyny.

W czwartej publikacji poddano ocenie metody elektrochemiczne do generowania produktów utleniania i redukcji aktywnych substancji farmaceutycznych a dokładnie dantrolen, nitrofurantoinę, furazydynę i nitrofural. W pierwszym etapie zastosowano woltamperometrię cykliczną do oceny elektroaktywności tych związków. W drugim etapie produkty przemiany wybranych API po elektrochemicznym utlenianiu i redukcji analizowano na spektrometrze masowym QTOF o wysokiej rozdzielczości. W ramach prowadzonych badań Autorki zidentyfikowano za pomocą techniki QTOF siedemnaście produktów degradacji. Strukturę większości z tych produktów potwierdzono również zastosowanymi metodami obliczeniowymi. Przeprowadzone badania stanowią podstawę dla opracowania metodologii umożliwiające między innymi zwiększenie bezpieczeństwa produktów leczniczych przeznaczonych dla pacjentów. Buduje również podstawy metodologiczne umożliwiające elektrochemiczną syntezę nowych produktów rozpadu i zanieczyszczeń.

W tekście całej pracy widoczne jest zaangażowanie i ogromny wysiłek w tworzenie wszystkich elementów dysertacji. Opisane w rozprawie badania reprezentują logiczny ciąg prac ilustrujący perspektywę która, pozwala zaznajomić się z najnowszymi trendami problematyki związanej z nitrozoaminami. Zastosowane metody mogą być wprost aplikowane do rozstrzygania praktycznych problemów codziennej analizy pozostałości nitrozoamin. Wynikiem przeprowadzonych badań są konkretne metody służące zarówno predykcji zagrożeń jak i ich bezpośredniej identyfikacji. Pod tym względem zaprezentowane wyniki prac

prowadzonych przez Doktorantkę odzwierciedlają oczekiwania nie tylko środowiska naukowego lecz także potrzeby laboratoriów kontroli jakości. Z pewnością przedstawione metody analityczne będą również mogły być ponownie optymalizowane i rewalidowane dla wielu różnych matryc. Jest to możliwe dzięki niskiej złożoności przedstawionych procedur przy zachowaniu niezmiernie detalicznego opisu.

W tekście dysertacji a także w przedstawionych publikacjach, Doktorantka przywołała odpowiednio dobraną bibliografię. Dostępne źródła zostały przeanalizowane w sposób skrupulatny. Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska, stanowi ciekawe i nowoczesne zestawienie prac naukowych. Tekst rozprawy inspirowe, skłania również do postawienia kilku pytań:

Pytanie 1. W kontekście treści publikacji 1. Dopuszczalne dzienne spożycie N-nitrozoamin jest obiektem odpowiednich regulacji. Wiadomo jednak że człowiek nie jest narażony tylko na jedną z nitrozoamin lecz na dziesiątki innych substancji groźnych dla zdrowia jednocześnie. Są one również obecne choćby w żywności na dozwolonym „niskim poziomie”. Czy istnieją badania lub regulacje które potwierdzają lub wykluczają potęgowanie się efektów toksycznych kilku takich substancji jednocześnie. Szczególnie w sytuacji w których dochodzi do interakcji na poziomie toksykodynamicznym – efektu działania kilku substancji obecnych w spożywanych pokarmach lecz obecnych nadal na akceptowalnych z punktu widzenia regulacji „niskich” poziomach. Jakie kompleksowe rozwiązania zaproponowałaby Pani w tym zakresie.

Pytanie 2. W publikacji drugiej podkreślono niską kosztocłonność opisaną metodę równocześnie wskazując na wysoką czułość. Czy można obecną metodę w kontekście jej czułości oraz liczby analitów porównać do jakiegokolwiek innej metody UPLC lub UHPLC w której nie zastosowano złożonych procedur SPE, SPME czy DLLEM.

Pytanie 3. Trzecia publikacja w pewnym sensie nawiązuje bezpośrednio do założeń metodologicznych drugiej publikacji. Autorka stwierdza w trzeciej pracy że cyt.: „Ryfampicyna, zgodnie z literaturą i naszymi danymi eksperymentalnymi (na GC-MS/MS), rozkłada się w podwyższonych temperaturach do MNP”. Powstaje zatem pytanie czy w procedurach mających na celu badania przesiewowe z zastosowaniem GC narażenie próbki na wysoką temperaturę może prowadzić do fałszywie pozytywnego wyniku. Czy jest to możliwe i jak

uniknąć takiego zafałszowania. Czy istnieją badania w których tą samą próbkę kontrolną poddawano analizom LC oraz GC w sytuacjach w których czynnik temperatury mógłby indukować takie mechanizmy. Wreszcie czy rozwiązania typu ESI w technikach LC związku z temperaturą niektórych elementów źródła może również generować fałszywie pozytywne wyniki.

Pytanie 4 Badania opublikowane w czwartej pracy obejmowały wykorzystanie rozwiązań typowych między innymi dla klasycznych detektorów amperometrycznych. Jak określiłaby Pani przydatność do tego typu zastosowań rozwiązań stosowanych w detektorach kulometrycznych.

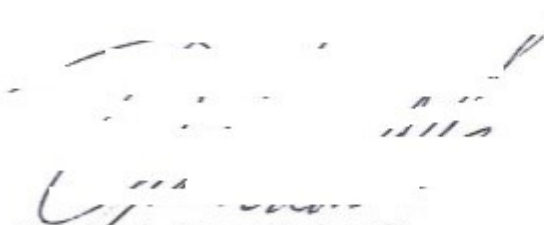
Podsumowując stwierdzam, iż przedłożona do oceny rozprawa doktorska mgr Anny Witkowskiej spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne. Wyniki przedstawionych badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach i stanowią podsumowanie nowatorskich osiągnięć Autorki. Postawione przez Autorkę cele badawcze zostały osiągnięte, a wyniki przeprowadzonych badań poddano detalicznej weryfikacji oraz walidacji zgodnej z wymogami GMP. Zakres zrealizowanych badań był szeroki. Ma duże znaczenie praktyczne, a wyniki prowadzonych prac w postaci metod zostały zaimplementowane w praktyce. Maszynopis pracy został przygotowany z dbałością o szczegóły. Oceniana praca napisana jest przejrzystie, z zastosowaniem fachowej terminologii.

Przytoczone wyżej uwagi, nie umniejszają wartości merytorycznej recenzowanej rozprawy. Dlatego uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska, mgr Anny Witkowskiej pt.: „Analiza związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin” w pełni odpowiada warunkom określonym w:

- Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce”

Biorąc powyższe pod uwagę, przedkładam Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Anny Witkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Przedstawiona dysertacja jest wiarygodnym dowodem zaangażowania, zaangażowania i biegłości merytorycznej Doktorantki. Cele naukowe a przy tym szerokie możliwości aplikacyjne przeprowadzonych prac są niepodważalne. W związku z powyższym przedkładam również Radzie Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o wyróżnienie wymienionej wyżej dysertacji.



prof. dr hab. Tomasz Grabowski