



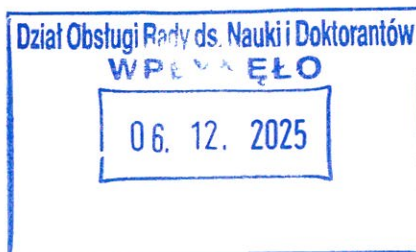
UNIwersytet
Warszawski

Wydział Chemii



Warszawa, 6 grudnia 2025

dr hab. Maciej Mazur, prof. ucz.
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski
ul. Pasteura 1
02-093 Warszawa



Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Barbary Witkowskiej pod tytułem "Analiza związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin"

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Anny Barbary Witkowskiej pod tytułem "Analiza związków azoto-organicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin" została zrealizowana pod kierunkiem merytorycznym dr hab. n. farm. Joanna Giebułtowicz z Zakładu Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej w Warszawskim Uniwersytecie Medycznym oraz dr hab. n. farm. Elżbiety Stolarczyk z Zakładu Metod Spektrometrycznych w Narodowym Instytucie Leków.

Tematem pracy są wybrane zagadnienia dotyczące analizy związków azotoorganicznych, w tym w szczególności nitrozoamin i hydrazonów, w produktach farmaceutycznych. Oznaczanie jakościowe i ilościowe nitrozoamin stanowi obecnie wyjątkowo istotny i aktualny obszar badań, przede wszystkim ze względu na ich udokumentowany potencjał rakotwórczy oraz zdolność do powstawania w wielu produktach codziennego użytku, w tym w żywności, wodzie, kosmetykach i produktach leczniczych. Zainteresowanie tą grupą związków znacząco wzrosło po 2018 roku, kiedy to wykryto ich obecność w szeregu leków o dużej skali stosowania. Współczesne regulacje prawne wymagają ścisłej kontroli poziomu nitrozoamin, co wymusza rozwój wysoce czułych i selektywnych metod analitycznych. Dokładne oznaczanie tych zanieczyszczeń ma kluczowe znaczenie dla oceny bezpieczeństwa pacjentów, zapewnienia zgodności produktów z restrykcyjnymi normami oraz identyfikacji potencjalnych źródeł ich powstawania. Badania nad nitrozoaminami umożliwiają nie tylko monitorowanie ryzyka, ale także lepsze zrozumienie procesów degradacji, reaktywności chemicznej i wpływu warunków produkcji na jakość farmaceutyków. Również inne klasy związków

azotoorganicznych, takie jak hydrazony, choć zwykle charakteryzują się odmiennym profilem reaktywności i potencjałem toksykologicznym, mogą pełnić rolę prekursorów reakcji prowadzących do formowania bardziej reaktywnych produktów, w tym potencjalnie nitrozoaminowych. W tym kontekście analiza związków azotoorganicznych stanowi obecnie jedno z najbardziej aktualnych i dynamicznie rozwijających się zagadnień w ocenie jakości, bezpieczeństwa oraz stabilności produktów chemicznych i farmaceutycznych.

Rozprawa liczy 100 stron i składa się z cyklu 4 publikacji naukowych poprzedzonych ponad dwudziestostronicowym komentarzem. Komentarz ten stanowi wprowadzenie do publikacji, określając zakres poruszanej w nich tematyki oraz streszczając najważniejsze uzyskane osiągnięcia i wyniki. Mgr Witkowska omawia w nim między innymi zagadnienia dotyczące potencjalnych zagrożeń wywoływanych związkami azotoorganicznymi, wymagań agencji regulacyjnych dotyczących zawartości takich związków w produktach farmaceutycznych, parametrów kwantyfikujących zagrożenia (m. in. dopuszczalne spożycie, maksymalna dawka produktu leczniczego, limit dopuszczalny) oraz metod oznaczania zawartości zanieczyszczeń. Opis kończy wskazanie perspektywicznych kierunków badań związków azotoorganicznych w najbliższych latach oraz bibliografia, na którą składa się 45 pozycji.

Następnie Doktorantka przedstawia założenia i cel rozprawy doktorskiej. Jak wskazuje, głównym celem pracy było opracowanie oraz walidacja nowych metod chromatograficznych oznaczania wybranych związków azotoorganicznych, w tym N-nitrozoamin, jak również synteza nowych związków azotoorganicznych. Cel pracy został poprawnie sformułowany. Można co najwyżej mieć wątpliwości, czy mgr Anna Witkowska faktycznie przeprowadzała syntezę związków azotoorganicznych. Na pewno w przedstawionych w dalszej kolejności publikacjach nie ma opisu klasycznych syntez organicznych, gdzie celem byłoby planowe otrzymanie określonych związków chemicznych. Przedstawiony jest natomiast opis przemian elektrochemicznych szeregu związków i zapewne to Doktorantka miała na myśli.

Trzon pracy stanowią 4 publikacje, w których mgr Witkowska jest współautorką. Pierwsza praca zatytułowana *Nowe aspekty metodyki oznaczania N-nitrozoamin* opublikowana została w języku polskim w czasopiśmie *Przemysł Chemiczny* i ma charakter przeglądu literaturowego. Przedstawia ona zakres aktualnej wiedzy na temat metod oznaczania N- nitrozoamin, grupy związków o potencjalnych właściwościach rakotwórczych i teratogennych. Istotną częścią publikacji jest omówienie mechanizmów ich powstawania, co przedstawione zostało na szeregu schematów. Znajomość reakcji chemicznych, w których powstają związki szkodliwe jest kluczowe z punktu widzenia analizy ryzyka w przemyśle farmaceutycznym.

W następnym rozdziale publikacji szczegółowo przedstawiono zastosowanie technik analitycznych oznaczania nitrozoamin, w tym chromatografii cieczowej i gazowej oraz elektroforezy kapilarnej, sprzężonych z różnymi typami detekcji, m.in. fluorescencyjnej, spektrofotometrycznej oraz z zastosowaniem spektrometrii mas. Dane w znaczącej części przedstawione są w formie tabelarycznej, co jest dobrym rozwiązaniem z punktu widzenia przejrzystości i systematyczności.

Podsumowując, publikacja stanowi bardzo wartościowy i aktualny przegląd metodologii oznaczania nitrozoamin. Wskazuje na złożoność problemów z tym związanych, jak również dynamiczny rozwój technik analitycznych oraz regulacji, które sprawiają, że tematyka ta pozostaje niezwykle aktualna z perspektywy bezpieczeństwa terapeutycznego i ochrony zdrowia publicznego.

Drugi artykuł, zatytułowany *Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS*, został napisany w języku angielskim i opublikowany w czasopiśmie International Journal of Molecular Sciences.

Przedstawia on opracowanie i pełną walidację nowej metody analitycznej GC-MS umożliwiającej jednoczesne oznaczanie dziewięciu genotoksycznych nitrozoamin w trzech substancjach czynnych farmaceutyków. Opracowana metoda charakteryzuje się uniwersalnością, wysoką czułością, niskimi kosztami eksploatacyjnymi oraz prostym przygotowaniem próbki. Metoda została zoptymalizowana pod kątem doboru rozpuszczalnika, parametrów wirowania oraz warunków chromatograficznych, co pozwoliło uzyskać bardzo niskie granice oznaczalności oraz pełen rozdział wszystkich analizowanych związków.

W następnym kroku, zgodnie z wytycznymi Międzynarodowej Rady ds. Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Produktów Farmaceutycznych Stosowanych u Ludzi (ICH), przeprowadzona została jej walidacja, obejmująca badanie liniowości, precyzji, dokładności, stabilności i odporności na zmiany parametrów. Opracowana metoda charakteryzuje się wysoką powtarzalnością oraz brakiem interferencji matrycowych, a jej czułość jest porównywalna lub wyższa niż w przypadku alternatywnych, bardziej złożonych metod analitycznych. Na koniec procedura została zastosowana do trzech wybranych substancji czynnych, cilostazolu, sunitinibu i olmesartanu medoksomilu, wykazując brak nitrozoamin w dwóch pierwszych substancjach oraz śladową obecność w olmesartanie.

Zaproponowana metoda może być z powodzeniem wdrażana jako uniwersalne narzędzie przesiewowe do kontroli jakości substancji czynnych narażonych na powstawanie nitrozoamin, związane z ich strukturą chemiczną lub procesem technologicznym. Jej prostota, niskie zużycie rozpuszczalników i wysoka czułość czynią ją alternatywą dla bardziej złożonych i kosztownych procedur stosowanych rutynowo.

W mojej ocenie artykuł jest bardzo dobrze zorganizowany, metodycznie dopracowany i przedstawiony w sposób klarowny. Wyniki są przekonujące, a zaproponowana procedura stanowi realne narzędzie do stosowania w laboratoriach kontroli jakości.

Trzecia z cyklu publikacji zatytułowana *Development and Validation of LC-MS/MS Method for the Determination of 1-Methyl-4-Nitrosopiperazine (MNP) in Multicomponent Products with Rifampicin - Analytical Challenges and Degradation Studies* opublikowana została w periodyku naukowym *Molecules*.

Artykuł omawia wyniki badawcze dotyczące opracowania i walidacji metody LC-MS/MS oznaczania 1-metylo-4-nitrozopiperazyny (MNP), genotoksycznej nitrozoaminy powstającej w produktach farmaceutycznych zawierających rifampicynę.

Opracowanie metody analitycznej było złożonym zadaniem, co wynikało ze znacznej polarności i niewielkiej masy cząsteczkowej analitu. Przeprowadzono szeroki proces optymalizacji chromatograficznej, obejmujący wybór kolumn, opracowanie odpowiedniego gradientu elucji, konfigurację spektrometru mas oraz przygotowanie próbki. Walidacja opracowanej metody została przeprowadzona zgodnie z wymaganiami ICH, obejmując ocenę jej liniowości, selektywności, dokładności oraz parametrów czułości. Uzyskane wyniki potwierdziły, że metoda charakteryzuje się wysoką powtarzalnością i wystarczającą czułością do oznaczania MNP na poziomie śladowym.

Niezwykle interesującym elementem pracy są badania degradacyjne rifampicyny. Rifampicina ulega degradacji, której produktem jest MNP. Proces taki był już opisywany w literaturze jako wywołany podwyższoną temperaturą oraz obecnością wody, ale mgr Witkowska i wsp. wykazali, że może on zachodzić w wyniku działania czynników utleniających. Pod wpływem relatywnie niewielkiego stężenia nadtlenu wodoru (3%) stężenie nitrozoaminy wzrasta 2-3 rzędy wielkości. Obserwacja ta ma duże znaczenie z punktu widzenia konieczności rewizji nie tylko metod i procesów wytwarzania farmaceutyku, ale również jego przechowywania, tak aby eliminować lub ograniczać tworzenie się nitrozoamin. W tym kontekście niezwykle ciekawe byłyby badania utleniania elektrochemicznego rifampicyny, podobne do tych opisanych w czwartej z publikacji składających się na rozprawę doktorską. Dlaczego takie badania nie zostały przeprowadzone i jakich obserwacji można byłoby się spodziewać? Czy elektrochemiczne utlenianie rifampicyny opisane jest w literaturze, a jeśli tak, czy produktem utleniania jest MNP lub inne nitrozoaminy?

Ostatnią z serii publikacji składających się na rozprawę doktorską mgr Anny Witkowskiej jest praca opublikowana w *International Journal of Molecular Sciences* pod tytułem: *Oxidation and Reduction of Hydrazones — Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs*. Stanowi ona obszerne opracowanie dotyczące stabilności oraz potencjalnych produktów degradacji substancji czynnych zawierających grupę hydrazonową. Wykorzystano połączenie technik

elektrochemicznych z wysokorozdzielczą spektrometrią mas, wspomaganych obliczeniami DFT i narzędziami *in silico*, aby zidentyfikować produkty utleniania i redukcji takich związków jak dantrolen, nitrofurantoina, furazydyna i nitrofural. Podejście to umożliwiło modelowanie przemian redoks, które mogą zachodzić zarówno podczas przechowywania, jak i w trakcie produkcji leków.

W pierwszej części pracy prezentowane są badania redukcji i utleniania badanych związków z wykorzystaniem woltamperometrii cyklicznej. W dyskusji wyników podawane są wartości prądów wyrażone w μA . Wydaje się, że właściwszym byłoby tu operowanie raczej gęstościami prądu, a nie natężeniami prądu. W przypadku krzywych redukcji (Fig. 2A), dla wielu związków obserwuje się więcej niż jeden sygnał elektrochemiczny, ale nie jest to komentowane w tekście. Czy obecność wielu etapów redukcji obserwowanych na krzywych woltamperometrycznych koreluje w jakikolwiek sposób np. z liczbą produktów identyfikowanych na podstawie pomiarów spektrometrii mas? Z kolei na krzywych utleniania (Fig. 2B), piki anodowe są bardzo słabo wykształcone. Gdzie na krzywej dla dantrolenu widoczny jest pik utleniania? Tajemnicą pozostaje też sposób wyznaczenia prądu tego piku. Dlaczego prądy na elektrodzie w roztworze elektrolitu podstawowego są wyraźnie wyższe, niż w obecności związków? Czy roztwór po utlenianiu samego materiału elektrodowego badany był z wykorzystaniem spektrometrii mas? Dlaczego woltamperometria cykliczna nie została przeprowadzona na elektrodzie z diamentu domieszkowanego borem, tak jak w przypadku pomiarów wykorzystujących aparat ROXYTM EC?

Niezależnie od tych polemicznych pytań, wyniki przedstawione w pracy są niezwykle interesujące. Łącznie zidentyfikowano szereg produktów utleniania i redukcji badanych związków, w tym nieopisywanych w literaturze. Identyfikacja została poparta analizą dokładnej masy, wzorców fragmentacji oraz oceną stabilności termodynamicznej z obliczeń DFT. Wyniki te mają istotne znaczenie, gdyż pokazują, że związki zawierające ugrupowanie hydrazonowe mogą ulegać złożonym przemianom redoks, prowadząc do powstawania wielu potencjalnych zanieczyszczeń, w tym takich o nieznanej wcześniej strukturze. Artykuł pokazuje również rolę metod elektrochemicznych jako alternatywy dla bardziej klasycznych badań degradacji substancji aktywnych. Metody te pozwalają szybko oszacować ryzyko degradacji i wskazać potencjalnie niebezpieczne produkty.

Rozprawę doktorską kończy krótkie podsumowanie, w którym mgr Witkowska przywołuje największe osiągnięcia opisane w pracy. W dalszej części zamieszczone zostały kopie dokumentów potwierdzających wdrożenia rozwiniętych metod analitycznych, oraz oświadczeń o wkładzie współautorów do poszczególnych publikacji. Wskazują one jednoznacznie, że wymogi stawiane doktoratom wdrożeniowym zostały w pełni spełnione, a udział samej Doktorantki w przeprowadzonych badaniach ma charakter wiodący i samodzielny.

Pracę doktorską mgr Anny Witkowskiej oceniam bardzo wysoko. Mam natomiast uwagę natury technicznej. Trzem publikacjom wchodzącym w skład rozprawy doktorskiej towarzyszą materiały dodatkowe (tzw. Supplementary Material), które jednak nie zostały załączone. W publikacjach tych bardzo częste są odwołania do danych i rysunków z Supplementary Material, ale żeby do nich dotrzeć, trzeba poszukać ich na stronie internetowej wydawcy.

W tym miejscu rodzi się pytanie natury filozoficznej. Czy materiały dodatkowe stanowią część rozprawy doktorskiej, czy też nie? Jeśli stanowią, dlaczego nie zostały dołączone do pliku PDF i drukowanej wersji pracy? Jeśli nie wchodzi w jej skład, praca doktorska zawiera szereg odwołań do danych i rysunków, których w pracy nie ma. Próbując rozwiązać ten fundamentalny dylemat odwołałem się do logiki dialektycznej, która neguje klasyczne prawo wyłączonego środka, czyli słynne: *Tertium non datur*. W logice dialektycznej coś jednocześnie może czymś być i nie być. Przyjąłem więc, że materiały dodatkowe jednocześnie są i nie są częścią pracy doktorskiej mgr Anny Witkowskiej. Skojarzenia z kotem Schrödingera są tu czysto przypadkowe.

Kolejna uwaga ma z kolei charakter językowy. Pani mgr Anna Witkowska zatytułowała swoją pracę: "Analiza związków azoto-organicznych..." pisząc „azoto-organicznych” rozdzielnie, z łącznikiem. Zgodnie z dokumentem Rady Języka Polskiego „Zasady pisowni i interpunkcji polskiej” z roku 2024, niesamodzielne części rodzime i obce pisze się łącznie z wyrazami zapisywanymi małą literą, np. okołobiegunowy, pseudoartysta, czy wokołoziemski. Zasady te jednak obowiązują dopiero od 1 stycznia 2026 – jest to termin po dacie złożenia rozprawy doktorskiej. Pozostajemy więc znów w superpozycji stanów: obowiązuje - nie obowiązuje. Niezależnie od tego, doradzałbym mgr Witkowskiej dokładne przeczytanie tematu, gdy będzie przygotowywać swoją pracę habilitacyjną.

Chciałbym podkreślić, że podniesione w recenzji kwestie mają charakter polemiczny i nie wpływają na ogólną bardzo wysoką ocenę całej pracy. Jest to rozprawa dojrzała, spójna i przemyślana, a przedstawione w niej wyniki badań stanowią realny wkład w rozwój współczesnej analityki związków azotoorganicznych. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia złożonych badań, a także zdolnością krytycznej analizy i trafnego interpretowania uzyskanych rezultatów.

Wnioski końcowe

Po starannym zapoznaniu się z pracą doktorską Pani mgr Anny Witkowskiej oceniam, że cele pracy zostały jasno sformułowane, a zastosowane materiały i metody badawcze pozwoliły na ich pomyślną realizację. Praca wpisuje się w dynamicznie rozwijany na całym świecie nurt badań nad oznaczaniem związków nitroorganicznych w produktach farmaceutycznych. Co więcej, jej interdyscyplinarny charakter, obejmujący analitykę instrumentalną, elektrochemię, badania degradacyjne oraz aspekty regulacyjne, czyni ją szczególnie wartościową z punktu widzenia zarówno

nauki, jak i praktyki laboratoryjnej. Wyniki otrzymane przez Doktorantkę mają charakter nie tylko poznawczy, lecz także praktyczny, mogą bowiem bezpośrednio wspierać procesy oceny jakości i bezpieczeństwa produktów leczniczych.

Uważam, że głównym atutem rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Witkowskiej jest szeroki zakres prowadzonych badań i kompetentne wykorzystywanie metod i wiedzy z różnych dziedzin nauki. Jestem pod ogromnym wrażeniem pomysłowości, erudycji i dojrzałości naukowej Autorki. Fundamentalne znaczenie ma też aspekt aplikacyjny uzyskanych wyników badawczych. Oprócz czterech bardzo dobrych publikacji naukowych, które składają się na rozprawę, Pani mgr Witkowska jest współautorką 16 innych prac naukowych.

Biorąc pod uwagę powyższe stwierdzam, że praca doktorska spełnia wszelkie warunki określone w obowiązujących przepisach Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, jak również wewnętrznych regulacjach Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczących rozpraw doktorskich, w tym w szczególności wymogi stawiane doktoratom o charakterze wdrożeniowym. Wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Anny Barbary Witkowskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na wysoką ocenę merytoryczną pracy doktorskiej, jej nowatorstwo i aspekt wdrożeniowy, wnioskuję o jej wyróżnienie.

Maciej
Mazur

Elektronicznie podpisany
przez Maciej Mazur
Data: 2025.12.06 16:06:25
+01'00'

