



dr hab. n. farm. Bartosz Wielgomas, prof. uczelni

Gdańsk, 08 stycznia 2026

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Anny Barbary Witkowskiej

pt. „Analiza związków azotoorganicznych w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych ze szczególnym uwzględnieniem nitrozoamin”

Rozprawa doktorska mgr Anny Barbary Witkowskiej została wykonana w Zakładzie Chemii Leków, Analizy Farmaceutycznej i Biomedycznej Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Zakładzie Metod Spektrometrycznych Narodowego Instytutu Leków pod kierunkiem promotora dr hab. n. farm. Joanny Giebułtowicz, przy udziale promotora pomocniczego dr hab. n. farm. Elżbiety Stolarczyk.

Praca została zrealizowana w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” (DWD/5/0401/2021).

Recenzja została sporządzona zgodnie z wymaganiami określonymi w Ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce oraz aktach wykonawczych, ze szczególnym uwzględnieniem oceny oryginalności, wartości naukowej, poprawności metodologicznej, samodzielności Doktorantki oraz znaczenia rozprawy dla dyscypliny nauk farmaceutycznych.

Rozprawa ma formę cyklu czterech powiązanych tematycznie publikacji naukowych, uzupełnionych częścią opisową. Trzy publikacje mają charakter oryginalnych prac eksperymentalnych, natomiast jedna jest pracą przeglądową. Wszystkie prace zostały opublikowane w recenzowanych czasopismach (jedno krajowe, pozostałe zagraniczne), a Doktorantka jest ich pierwszym autorem. Łączny współczynnik oddziaływania IF czasopism, w których opublikowano wchodzące w skład rozprawy publikacje, wynosi 15,19.

W skład rozprawy wchodzi następujące publikacje:

1. **Witkowska, A.B.**; Zezula, M.; Glice, M.; Stolarczyk, E.U.; Nowe aspekty metodyki oznaczania N-nitrozoamin, *Przemysł Chemiczny* 2021;100(3):230-239. DOI: 10.15199/62.2021.3.3 Punkty IF: 0,49.
2. **Witkowska, A.B.**; Giebułtowicz, J.; Dąbrowska, M.; Stolarczyk, E.U.; Development of a Sensitive Screening Method for Simultaneous Determination of Nine Genotoxic Nitrosamines in Active Pharmaceutical Ingredients by GC-MS; *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(20): 1-11. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms232012125> Punkty IF: 5,6.
3. **Witkowska, A.B.**; Wotczyńska, A.; Lis-Cieplak, A.; Stolarczyk, E.U. 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; *Molecules* 2023; 28(21):1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules28217405> Punkty IF: 4,2.
4. **Witkowska, A.B.**; Stolarczyk, K.; Fusaro, M.; Leś, A.; Giebułtowicz, J.; Stolarczyk, E.U. Oxidation and Reduction of Hydrazones—Risk Factors Related to the Manufacture and Stability of the Drugs;

Podjęta tematyka badawcza dotyczy związków azotoorganicznych, w szczególności N-nitrozoamin – grupy zanieczyszczeń o udokumentowanym potencjale genotoksycznym i rakotwórczym. Od momentu identyfikacji NDMA i NDEA w produktach leczniczych zawierających sartany problem nitrozoamin stał się jednym z kluczowych wyzwań w zakresie bezpieczeństwa farmakoterapii, prowadząc do istotnych zmian regulacyjnych na poziomie międzynarodowym. W tym kontekście podjęcie niniejszej tematyki należy ocenić jako w pełni uzasadnione, aktualne i istotne zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Głównym celem pracy był rozwój, walidacja i zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych do identyfikacji oraz oznaczania związków azotoorganicznych, w szczególności genotoksycznych N-nitrozoamin, w próbkach farmaceutycznych i przemysłowych. Cele szczegółowe obejmowały opracowanie metody przesiewowej, badania stabilności substancji czynnych, analizę mechanizmów powstawania wybranych zanieczyszczeń i produktów transformacji oraz odniesienie uzyskanych wyników do aktualnych wymagań regulacyjnych.

Przedstawione w rozprawie zagadnienie oznaczania nitrozoamin w substancjach aktywnych i produktach leczniczych dotyczy obszaru analizy śladowej, który do niedawna nie stanowił standardowego elementu rutynowej kontroli jakości w przemyśle farmaceutycznym. Z tego względu jego realizacja wiąże się z istotnymi wyzwaniami zarówno aparaturowymi, jak i metodycznymi. Zauważalnym efektem „kryzysu nitrozoaminowego” jest wdrażanie w wielu laboratoriach technik opartych na spektrometrii mas, w szczególności GC-MS oraz LC-MS(/MS), które wcześniej były wykorzystywane głównie w badaniach specjalistycznych, a nie w analizach rutynowych. W tym kontekście zasadne wydaje się zwrócenie uwagi, że wybór techniki analitycznej nie powinien być rozpatrywany wyłącznie przez pryzmat osiągniętej czułości czy selektywności, lecz również z punktu widzenia jej kosztowej efektywności oraz możliwości praktycznego zastosowania w warunkach rutynowych. Techniki oparte na LC-MS(/MS), choć oferują bardzo niskie granice wykrywalności czy oznaczalności, wiążą się z wysokimi kosztami inwestycyjnymi i eksploatacyjnymi, a także z koniecznością zapewnienia wysoko wykwalifikowanego personelu. W wielu przypadkach alternatywne podejście oparte na GC-MS może stanowić rozwiązanie bardziej dostępne i ekonomicznie uzasadnione, pod warunkiem właściwego dopasowania zakresu analitów oraz procedury przygotowania próbki.

Na podkreślenie zasługuje również aspekt złożoności i pracochłonności procedur analitycznych. Rozbudowane etapy przygotowania próbki, często niezbędne do osiągnięcia bardzo niskich granic oznaczalności, mogą istotnie wpływać na całkowity koszt analizy, jej powtarzalność oraz ryzyko powstawania artefaktów analitycznych, w tym wtórnego nitrozowania. Z tego względu w ocenie metod zastosowanych w rozprawie doktorskiej warto uwzględnić stopień ich miniaturyzacji, prostoty oraz podatności na wdrożenie w analizach wysokoprężowych.

Krótkie omówienie poszczególnych prac wchodzących w skład rozprawy.

Publikacja pierwsza ma charakter przeglądowo-metodyczny i koncentruje się na nowych aspektach oznaczania *N*-nitrozoamin, ze szczególnym uwzględnieniem problemów analitycznych wynikających z ich właściwości fizykochemicznych oraz niskich stężeń w próbkach. Doktorantka wraz ze współautorami omawiają podstawowe strategie analityczne stosowane w oznaczaniu nitrozoamin, wskazując na ograniczenia klasycznych podejść oraz rosnącą rolę technik opartych na spektrometrii mas. Praca pełni funkcję wprowadzającą i porządkującą zagadnienie w kontekście krajowej literatury branżowej.

W drugiej pracy zaprezentowano opracowanie czułej metody GC-MS, określonej jako przesiewowej, umożliwiającej jednocześnie oznaczanie dziewięciu genotoksycznych nitrozoamin w substancjach czynnych. Autorzy skupiają się na optymalizacji warunków chromatograficznych i detekcji mas, a także na ocenie parametrów walidacyjnych metody. Publikacja podkreśla potencjał GC-MS jako narzędzia przesiewowego w analizie API, zwracając uwagę na możliwość równoczesnego oznaczania wielu analitów przy zachowaniu odpowiedniej czułości. Zastosowanie GC-MS ocenić należy jako adekwatne i ekonomicznie uzasadnione, gdyż chromatografia gazowa ze spektrometrią mas jest powszechnie stosowana do analizy lotnych zanieczyszczeń w API (substancjach czynnych) przy niskich kosztach operacyjnych.

Trzeci artykuł dotyczy opracowania i walidacji metody LC-MS/MS do oznaczania 1-metylo-4-nitrozopiperazyny (MNP) w wieloskładnikowych produktach leczniczych zawierających ryfampicynę. Zastosowanie chromatografii cieczowej sprzężonej z potrójnym kwadrupolem MS było jak najbardziej zasadne, zważywszy, że MNP jest mniej lotna i występuje w preparatach o skomplikowanym składzie (leki złożone przeciwcgruźlicze). Metodę dostosowano pod względem granicy wykrywalności do potrzeb wynikających z aktualnego limitu akceptowalnego tymczasowo przez FDA dla ryfampicyny. Warto zaznaczyć, że autorka nie poprzestała na opracowaniu samej metody ilościowej – przeprowadziła również badania degradacji wymuszonej ryfampicyny, identyfikując mechanizmy powstawania zanieczyszczenia MNP. Wykazano, że MNP może tworzyć się dwiema drogami: na skutek rozkładu samej ryfampicyny oraz w wyniku utleniania 1-amino-4-metylo-piperyzyny (fragmentu łańcucha bocznego ryfampicyny). Te wyniki dostarczają cennej wiedzy praktycznej, pozwalając producentom zrozumieć u źródła genezę zanieczyszczenia i potencjalnie modyfikować proces wytwórczy (np. eliminacja lub lepsza kontrola reagentów nitrozujących) w celu zapobiegania powstawaniu MNP.

Ostatnia publikacja z cyklu ma charakter bardziej mechanistyczny i dotyczy procesów utleniania i redukcji hydrazonów jako czynników ryzyka związanych z wytwarzaniem i stabilnością API oraz produktów leczniczych. Jest jednocześnie najbardziej innowacyjna dzięki zastosowaniu systemu elektrochemicznego sprzężonego ze spektrometrem mas o wysokiej rozdzielczości (Q-TOF). Metoda ta posłużyła do symulacji procesów utleniania i redukcji wybranych związków azotoorganicznych (leków zawierających grupę hydrazonową) w celu identyfikacji potencjalnych zanieczyszczeń powstających podczas wytwarzania lub przechowywania API lub produktu gotowego. W praktyce użyto układu reaktora elektrochemicznego ROXY EC, a powstające produkty transformacji były bezpośrednio analizowane za pomocą wysokorozdzielczego MS (ESI-QTOF). Takie połączenie umożliwia detekcję nawet bardzo reaktywnych, nietrwałych produktów przemian. Jest to zaleta nieosiągalna tradycyjnymi metodami stosowanymi w analizie stabilności, gdzie próbki zazwyczaj analizuje się dopiero po długotrwałej inkubacji z

odczynnikami chemicznymi. Adekwatność tej metody w kontekście rozprawy jest bardzo wysoka, ponieważ stanowi ona odpowiedź na zidentyfikowaną w literaturze potrzebę rozwoju narzędzi do wczesnego przewidywania tworzenia potencjalnych zanieczyszczeń (takich jak nitrozopochodne) zanim zostaną one wykryte w gotowych produktach. Doktorantka z współpracownikami wypełniła tę lukę, demonstrując, że elektrochemiczne utlenianie i redukcja substancji takich jak dantrolen, nitrofurantoina, furazydyna czy nitrofural pozwala zidentyfikować aż 17 różnych produktów transformacji tych substancji leczniczych. Identyfikacja oparta na HRMS była dodatkowo uwiarygodniona obliczeniami teoretycznymi DFT oraz porównaniem z produktami przewidywanymi *in silico*. Zastosowanie EC-HRMS do generowania i identyfikacji potencjalnych zanieczyszczeń należy uznać za podejście nowatorskie, pozwalające na pogłębienie wiedzy na temat mechanizmów powstawania produktów degradacji. Prace te wykraczają poza standardowe analizy rutynowe i mają charakter nauk podstawowych.

Doceniając wartość merytoryczną rozprawy można sformułować również kilka uwag o charakterze dyskusyjnym. W części opisowej miejscami widoczna jest dysproporcja pomiędzy rozbudowanym tłem regulacyjnym a krótszą dyskusją implikacji praktycznych uzyskanych wyników. Od tej części oczekiwałbym raczej wskazania w syntetycznej formie tego, co dzięki przeprowadzonym badaniom osiągnięto i jakie są konsekwencje uzyskanych wyników.

Poniżej przedstawiam szczegółowe uwagi do poszczególnych publikacji.

Publikacja I.

Sformułowanie „niskie poziomy stężen” jest niepoprawne pod względem językowym. Jest pleonazmem, czyli zbędnym powtórzeniem znaczenia („poziom” już oznacza stopień/stężenie). Poprawnie jest: „niskie stężenia” lub „niskie poziomy”.

Anglojęzyczny termin „*acceptable intake*” przetłumaczono jako „dopuszczalne dzienne spożycie”. Przez analogię do ADI (*acceptable daily intake*), za leksykonem NIZP-PZH, AI powinno być tłumaczone jako „akceptowane lub dopuszczalne pobranie” (pobranie jest pojęciem szerszym, niezależne od drogi ekspozycji), bo trudno mówić np. o spożyciu nitrozoamin będących zanieczyszczeniami produktu parenteralnego.

W publikacji użyto kilkakrotnie skrótu EMEA, podczas gdy od 2009 roku obowiązuje nazwa European Medicines Agency ze skrótem EMA.

Doktorantka klasyfikuje dietyloaminę do amin III-rzędowych (Sekcja: Analiza ryzyka w przemyśle farmaceutycznym), podczas gdy jest ona aminą II-rzędową.

Pod tabelą 2. skrót HRMS jest wyjaśniony jako „wysokorozdzielcza spektroskopia mas”, podczas gdy powinno być „wysokorozdzielcza spektrometria mas”.

W dalszej części tekstu, w dwóch zdaniach na stronie 233 (kolumna prawa) wymienione są nazwy substancji, w których stwierdzono obecność NDMA, po czym, w kolejnym zdaniu powtórzone są w większości te same substancje. Z kolei wśród „znanych lub podejrzewanych prekursorów” wymieniony jest zaskakująco chlorek metylenu, bez podania potencjalnego mechanizmu

tworzenia NDMA. Część z tych nazw jest niepoprawna lub nie ma uzasadnienia chemicznego, np.: metylometyl, metamforyna, tramadolina.

Publikacja II.

Określenie „medical product” nie jest pojęciem regulacyjnym ani precyzyjnym, określającym produkt leczniczy (domyślam się, że taka była intencja autorów) bądź API. Poprawnym pojęciem jest “medicinal product” w odróżnieniu od np. “medical device”.

W publikacji jako jednostkę stężenia wykorzystano ng/ml, mimo że matryca (API) jest ciałem stałym. O ile w kontekście kalibracji metody nie budzi to większych zastrzeżeń, to przedstawianie wyników oznaczeń nie jest poprawne. Powinno być wyrażone w ng/g lub w ppb (“DEA was detected in olmesartan medoxomil at a concentration of 1.66 ng/mL”).

Sekcja 2.2 Method development. Co Doktorantka rozumie jako „centrifugal extraction”? Nie jest to znana powszechnie technika ekstrakcji.

W sekcji 3.4 Sample preparation Doktorantka opisuje proces przygotowania próbki do analizy, który zakłada odważenie 150 mg API do próbówki filtracyjnej, dodanie 0,25 ml roztworu wzorca wewnętrznego będącego jednocześnie rozpuszczalnikiem ekstrahującym i wirowanie w kolejnym kroku. O ile, taki proces jest w stanie skutecznie wyizolować nitrozoaminy znajdujące się na powierzchni kryształów, to moją wątpliwość budzi skuteczność tego procesu wobec cząsteczek nitrozoamin uwięzionych w strukturze krystalicznej. Czy Doktorantka przeprowadziła badania oceniające skuteczność tej ekstrakcji poprzez analizę API z serii zawierających wykrywalne stężenia badanych nitrozoamin oznaczone inną metodą analityczną, w której rozpuszczano API? Czy np. nie sprawdzono wpływu wspomaganie ultradźwiękami, wytrząsania przed wirowaniem etc.? Dla przykładu, cytowana przez Doktorantkę metoda oznaczania NDMA za pomocą techniki LC-HRMS (wg FDA) zakłada całkowite rozpuszczenie API a w przypadku produktu leczniczego przygotowanie naważki produktu do uzyskania stężenia odpowiadającego 20 mg API/ml metanolu a następnie aż 40-minutowe wytrząsanie. Dopiero potem próbki są sączone i poddawano analizie instrumentalnej. Z badań prowadzonych w naszym laboratorium wynika, że analiza tego samego zestawu analitów: lotnych nitrozoamin techniką headspace z proszku API jest nieskuteczna i bardzo niepowtarzalna. Podobne obserwacje są opisane przez Golob i in. 2025 (<https://doi.org/10.1016/j.ejps.2025.107135>).

Dla niektórych analitów nie uzyskano rozdzielienia chromatograficznego do linii podstawowej (bazowej) co znacząco utrudnia interpretację chromatogramów (NPYR, NPIP, N-methyl-NPZ w olmesartanie), nie skomentowano tego również w manuskrypcie ani omówieniu doktoratu. Chromatogramy przedstawiono w materiałach dodatkowych na stronach internetowych wydawcy a nie były załączone do rozprawy.

Przeprowadzono ocenę stabilności roztworu próbki poprzez wykonanie dwóch niezależnych oznaczeń bezpośrednio po przygotowaniu próbki do analizy oraz 24 h później. Według jakich wytycznych testowano stabilność i jakie przyjęto kryteria akceptacji?

W publikacji ani w omówieniu nie skomentowano braku możliwości wykorzystania metody do oznaczania NPIP i N-methyl-npz w olmesartanie. Wydaje się mieć to istotne znaczenie traktując opracowaną metodę jako przesiewową. Czy prowadzono próby wyjaśnienia tego zjawiska? Poproszę o komentarz.

Publikacja IV.

W badaniach elektrochemicznych interesującym uzupełnieniem byłaby bardziej rozbudowana analiza porównawcza produktów generowanych elektrochemicznie z rzeczywistymi zanieczyszczeniami wykrywanymi w próbkach przemysłowych. W publikacji, produkty generowane w eksperymentach elektrochemicznych są konsekwentnie określane jako „impurities”, mimo że przedstawione dane odnoszą się do produktów transformacji powstających w warunkach stresowych EC. Brakuje jednoznacznego rozróżnienia pomiędzy rzeczywistymi zanieczyszczeniami API w rozumieniu wytycznych ICH a potencjalnymi produktami degradacji o charakterze predykcyjnym.

Zgłoszone w recenzji uwagi mają w większości charakter dyskusyjny lub redakcyjny i nie podważają zasadniczej wartości naukowej pracy.

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr Anny Barbary Witkowskiej stanowi spójne, oryginalne i wartościowe osiągnięcie naukowe w dyscyplinie nauk farmaceutycznych. Podjęta tematyka jest aktualna, istotna z punktu widzenia bezpieczeństwa farmakoterapii oraz silnie osadzona w bieżących wyzwaniach analitycznych i regulacyjnych związanych z obecnością genotoksycznych zanieczyszczeń w produktach leczniczych. Przedstawiony cykl publikacji obejmuje zarówno aspekty metodyczne, aplikacyjne, jak i mechanistyczne.

Doktorantka wykazała się bardzo dobrą znajomością nowoczesnych technik analitycznych opartych na spektrometrii mas, umiejętnością ich krytycznego doboru do właściwości oznaczanych analitów oraz zdolnością samodzielnego planowania i realizacji badań naukowych. Na szczególne podkreślenie zasługuje umiejętne łączenie zagadnień analitycznych z kontekstem regulacyjnym oraz praktycznymi implikacjami dla kontroli jakości i wytwarzania produktów leczniczych.

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Anny Barbary Witkowskiej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Bartosz Wielgomas
2026-01-08

