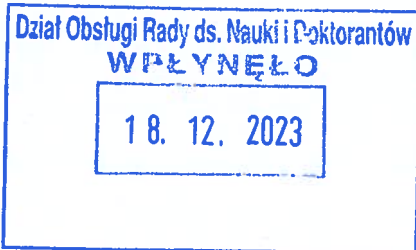




prof. dr hab. n. farm. Łukasz Komsta
Uniwersytet Medyczny w Lublinie
Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Leków
ul. Jaczewskiego 4, 20-090 Lublin, tel. 81 4487387, fax 81 4487381



Recenzja pracy doktorskiej mgr Elżbiety Gniazdowskiej

„Opracowanie nowych metod bioanalitycznych oraz optymalizacja sposobu ich walidacji”

PRZEDŁOŻONA do recenzji praca doktorska została wykonana pod promotorstwem dr hab. n. farm. JOANNY GIEBUŁTOWICZ i promotorstwem pomocniczym dr KATARZYNY BUŚ-KWAŚNIK w Zakładzie Chemii Leków Wydziału Farmaceutycznego WUM oraz Laboratorium Analityki Farmaceutycznej Instytutu Chemii Przemysłowej Sieci Badawczej Łukasiewicz w ramach programu „Doktorat wdrożeniowy” DW/03/2019.

Składa się z pięciu publikacji opublikowanych w *Pharmaceuticals* (IF = 5,863; MEiN = 100), *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (IF= 3,571; MEiN = 100), *Molecules* (IF= 4,600; MEiN = 140), *Journal of Chromatography B* (IF= 3,000; MEiN = 100) oraz *Prospects in Pharmaceutical Sciences* (IF= 0,100; MEiN: 20).

Pod względem bibliometrycznym pracę należy ocenić bardzo wysoko (łącznie daje to IF równy 17,134 oraz 460 punktów ministerialnych). Należy również pochwalić zwięzłość komentarza. Tak właśnie powinna wyglądać rozprawa stanowiąca zbiór publikacji - komentarz ma za zadanie tylko i wyłącznie wprowadzić w tematykę oraz zachęcić do dalszej lektury samych prac, które stanowią właściwą rozprawę.

Praca stanowi wyraźnie wyodrębnioną część pracy zbiorowej o wiodącym i wystarczającym wkładzie Doktorantki popartym oświadczeniami, a ponadto ze względu na obszerny artykuł poglądowy udowadnia ogólną wiedzę teoretyczną Autorki w uprawianej dziedzinie oraz samodzielność prowadzenia pracy naukowej.

Na temat walidacji metod analitycznych i bioanalitycznych napisano już wiele, jednakże w obliczu zmian wymagań walidacyjnych i publikacji nowych dokumentów pewne sprawy wymagają dalszych

dyskusji i stają się od nowa aktualne. Rozprawa wpisuje się w taki trend: stanowi nie tylko zbiór kilku wartościowych nowych metod analitycznych, ale również stawia ważne pytania dotyczące walidacji oraz stara się na nie odpowiedzieć.

Według Doktorantki wyniki *znajdują odzwierciedlenie w nowym wydaniu Standardowej Procedury Operacyjnej*, co nie jest dla mnie do końca jasne. Nie mogę nigdzie się doszukać informacji, czy publikacje Doktorantki brano pod uwagę w opracowywaniu tej procedury, czy jedynie chodzi o zgodność pomiędzy wynikami a tą nową procedurą.

Problem liczebności próby w badaniach jest tak stary, jak stosowanie prawideł statystyki w badaniach naukowych. To właśnie poszukiwanie optymalnej liczebności prób doprowadziło do odkrycia odstępstwa od rozkładu normalnego rozkładu wariancji z próby (rozkład χ^2 jest tylko asymptotycznie normalny) czy też standaryzowanej średniej z próby (tu z kolei jest to asymptotycznie normalny rozkład STUDENTA). Ze względu na zależności matematyczne stojące za tymi procesami nie istnieje żadne obiektywne kryterium, na podstawie którego można byłoby tę optymalną liczebność zidentyfikować, jednak subiektywne rekomendacje są zawsze wartościowym odniesieniem dla analityków.

Nie zgodzę się do końca ze stwierdzeniem, że przy liczebności 3 wynik może zostać obciążony przez obserwację odstającą, a przy większej liczebności już nie (ten wpływ zmniejsza się płynnie), jednak pragnę pochwalić Doktorantkę za odwagę pochylenia się nad tym problemem i przedstawienie pewnych propozycji. Obecność tej tematyki w nowej literaturze na pewno zwiększy swoistą świadomość tego zagadnienia i przyczyni się do dalszych rozważań oraz dyskusji.

Podobnym i często zaniegdywanym szczegółem jest kolejność analizy próbek. Doktorantka słusznie zauważa, że w wielu publikacjach kolejność analizy próbek nie jest raportowana i zakłada schemat blokowy i naprzemienny w sekwencji analizy, a całkowicie pomija kolejność losową. Dlaczego takiej kolejności nie można zastosować w warunkach analitycznych, w jakich obraca się Doktorantka? Według wszystkich prawideł teoretycznych tylko losowa kolejność próbek pozwala na możliwość obiektywnej oceny autokorelacji błędów oraz pewność, że wynika ona z samej aparatury (np. efektu matrycy) a nie innego czynnika skorelowanego przypadkowo z kolejnością, jak stężenie czy grupa próbek.

Na uznanie zasługuje chęć redukcji toksycznych odpadów i zastępowanie w tym celu toksycznych rozpuszczalników etanolem. Jednakże czy faktycznie redukuje to lepkość? Acetonitryl jest jednym

z najmniej lepkich rozpuszczalników, jakie mamy do dyspozycji, a etanol jest znacznie bardziej lepki od np. metanolu. Poza tym pojawia się pytanie, na ile lepkość samej próbki ma znaczenie dla analizy HPLC? Jeśli na jakimś etapie procesu CPE faktycznie lepkość zmniejsza się w takich warunkach, to prosilbym o rozwinięcie tego aspektu.

Niektóre części badań aż proszą się o zastosowanie porządnej metodyki projektowania eksperymentu wraz z obiektywną analizą uzyskanych wyników i matematyczną optymalizacją parametrów. Prosiłbym o dyskusję na obronie, jakie plany eksperymentu można byłoby zastosować do jednoczesnej optymalizacji czterech czynników takich jak stężenie Tritonu, AA, próbki i dodatku octanu amonu. Jaka byłaby przewaga nad przeprowadzoną metodyką? Czy można by było wówczas dodać do czynników optymalizowanych czas ekstrakcji (*equilibration time*), który finalnie niezbyt słusznie zaniedbano? Dlaczego wybrano do testów stężenia 10 — 30 % AA, skoro w tym samym akapicie stwierdzono, że zwykle stosuje się stężenie 4 — 6 %?

Czy stosowane przez Autorkę umieszczanie przedziału ufności próby w innym przedziale oraz obliczanie prawdopodobieństwa wykroczenia jednego przedziału poza drugi można byłoby zastąpić dwoma testami jednostronnymi o określonych wartościach referencyjnych 85 i 115? Jaka wtedy byłaby różnica, wady i zalety takiego rozwiązania? Jaki rozkład ma granica przedziału ufności z próby o rozkładzie normalnym?

Czy stosunek dwóch zmiennych o rozkładzie normalnym zawsze odbiega od rozkładu normalnego? Jak wygląda rozkład stosunku dwóch zmiennych o rozkładzie log-normalnym? Na ile silnie te odstępstwa mogą faktycznie zmieniać wyniki w przypadku analizy chemicznej?

Jakie byłyby wady i zalety, gdyby zamiast obrazowania kolorami wartości ME_A w przestrzeni głównych składowych, dodać tę wartość jako jeszcze jedną kolumnę do analizowanej macierzy?

Dlaczego zastosowano w kalibracji wagi $1/x$ i na jakiej podstawie wybrano taki a nie inny wariant regresji ważonej? Dlaczego nie mogła być użyta regresja bez ważenia?

Czy obecność EDTA w próbkach osocza mogła mieć jakiś wpływ na wynik analizy? Jeśli analizowano mieszaniny wzorców, to skąd było wiadomo, że taka mieszanina wszystkich analizowanych leków nie będzie wchodzić w reakcję ze sobą?

Wszystkie publikacje stanowiące rozprawę przeszły rygorystyczny proces edytorski w prestiżowych czasopismach. Ja również nie widzę w nich niczego, co wzbudzałoby wątpliwości, a moje rozważania i pytania nie wynikają z uchybień lub braków, lecz z zasygnalizowania możliwych tematów do dyskusji podczas obrony doktorskiej oraz możliwości dalszych badań w tym zakresie.

Recenzowana rozprawa stanowi rozwiązanie istotnych problemów naukowych, a do najważniejszych należy zaliczyć opracowanie nowoczesnych metod oznaczania 21 substancji czynnych wraz metabolitami w osoczu ludzkim, spełniających kryteria walidacyjne, gotowych do zastosowania w wielu dziedzinach, zaproponowanie kryteriów doboru liczebności próby oraz kolejności analizy w procesie walidacyjnym, wykazanie trwałości dutasterydu wynoszącej co najmniej 3 lata oraz arypiprazolu co najmniej 7 lat w temperaturze -65 °C.



Podsumowując, praca doktorska mgr Elżbiety Gniazdowskiej spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 ustawy z dnia 14 marca 2003 r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz.1789) oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz.1669). Wnioskuje zatem o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dodatkowo, biorąc pod uwagę aktualność tematyki badawczej oraz odwagę zmierzenia się z ważnymi fundamentalnymi problemami, co zaowocowało istotnym wkładem w literaturę dotyczącą teorii walidacji, z przyjemnością wnioskuje o wyróżnienie przedłożonej mi do recenzji pracy.

Katedra i Zakład Chemii Leków
Uniwersytetu Medycznego w Lublinie
prof. dr hab. Lukasz Komsta

Dokument podpisany przez
ŁUKASZ KOMSTA
Data: 2023.12.18 15:23:23
CET

Lublin, 18 grudnia 2023.