

Prof.zw. dr hab. n.farm. Marian Mikołaj Zgoda
Niestacjonarne Studium Doktoranckie
Katedra Farmacji Stosowanej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Pauliny Marii Materny

p.t.

„Synteza, badania strukturalne i właściwości alkiloamoniowych
pochodnych arylowych”

Recenzowana praca doktorska została zrealizowana na Wydziale Chemii Uniwersytetu
im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Konserwacja środków leczniczych niezależnie od ich postaci (formy) ma na celu zachowanie wymaganej czystości mikrobiologicznej przez cały okres jego przydatności do farmakoterapii a także przed wtórnym zakażeniem i rozwojem drobnoustrojów podczas przechowywania lub pobierania go w terapii zachowawczej z opakowań wielokrotnego użycia.

Związek chemiczny aby mógł być zastosowany jako konserwant środków leczniczych musi odpowiadać określonym wymaganiom ustalonym z punktu widzenia bezpieczeństwa chorego jak również zachowania odpowiedniej jakości preparatu leczniczego oraz utrzymanie wysokich standardów związanych z trwałością praktyczną rynkowej postaci preparatu leczniczego.

W Farmakopei Polskiej – wydanie FP V, tom II (z 1993r.) oraz w tomie III (z 1996r.) a także w aktualnym wydaniu FP X, tom I (z 2014r.) a przede wszystkim w monograficznym opracowaniu „Handbook of Pharmaceutical Excipients” z 2007r. (wydanym przez American Pharmacists Association) podano na przykładzie chlorku bezalkoniowego międzynarodowe wymagania związane z cechami dobrego środka konserwującego.

Szczególną uwagę zwrócono na jego rozpuszczalność w wymaganym do konserwacji stężeniu, trwałość i aktywność bójczą w szerokim zakresie pH(a_H^+) a także temperaturze, brak wpływu na działanie farmakologiczne leku i brak tworzenia tzw. „odległych” niezgodności recepturowych oraz jego fotostabilność.

Zaletą użytego środka konserwującego powinno być: efektywne i szybkie działanie przeciwbakteryjne w niskich stężeniach (problem MIC) a także trudność w wytwarzaniu form opornych na jego obecność.

W rynkowej, populacyjnej postaci preparatu leczniczego w stężeniu aplikacyjnym konserwant nie powinien wykazywać własnego działania toksycznego, alergizującego i drażniącego a w polipragmazji nawet farmakologicznego.

Współcześnie – w obszarze zachowawczej i klinicznej farmakoterapii formy leków w produkcji których należy stosować środki konserwujące (pojedyncze lub w zestawach) to: leki do oczu z wyjątkiem tzw. „minimsów” (forma jedno dawkowa), roztwory iniekcyjne i zawiesiny, krople do nosa i uszu, preparaty doustne z ekstraktami roślinnymi, roztwory

Aktualnie – światowa technologia postaci leku nie dysponuje idealnym, uniwersalnym środkiem konserwującym z tego też powodu określone ustawodawstwo i wymagania farmakopealne zalecają aby stosować je w zestawach.

Tak jak już podkreśliłem w poprzednich recenzjach (a ta jest trzecia) fundamentalnym problemem współczesnej konserwacji i solubilizacji micelarnej w technologii preparatów farmaceutycznych i wybranych rodzajów kosmetyków jest rząd wielkości krytycznego stężenia micelnego (cmc) oraz wielkość najmniejszego stężenia hamującego (MIC) a także postulat Rosena tj. także stężenie konserwantu (surfaktanta), przy którym obniżenie napięcia powierzchniowego nie przekroczy granicy fizjologicznej 52-48 mJ/m² (o 20 jednostek mniej w stosunku do $\gamma_{R2O}^{CS} = 71,98 \text{ mJ/m}^2$).

Centralna Komisja do Spraw Stopni i Tytułów w Ustawie z dn. 14 marca 2003 roku w art. 1 zwraca uwagę promotorowi aby recenzowana rozprawa doktorska stanowiła nie tylko o rozwiązaniu oryginalnego problemu naukowego przez Doktoranta lecz także potwierdziła jego ogólną wiedzę teoretyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Mając powyższe na uwadze stwierdzam, że już w załączonym w języku polskim i angielskim streszczeniu (str. 13-15) Doktorantka Pani mgr Paulina Maria Materna w jasny i czytelny sposób omawia nakreślony cel pracy i zakres zaprojektowanych badań nad wydajnością i powtarzalną syntezą nowych czwartorzędowych soli amoniowych – surfaktantów o oryginalnej budowie strukturalnej, którą wyróżnia aromatyczny łącznik i alifatyczny łańcuch węglowodorów zawierają od 4 do 18 atomów węgla w cząsteczce.

Zredagowana w oryginalny sposób, nie klasyczny praca doktorska została wykonana na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod promotorską opieką Pana Prof. UAM dr hab. Bogumiła Bryckiego, który to w „iście aptekarski sposób” wpłynął na zachowanie proporcji między częścią teoretyczną i eksperymentalną dysertacji a także na starannym jej udokumentowaniu i zredagowaniu poszczególnych jej segmentów.

W części teoretycznej rozprawy doktorskiej na które składają się rozdziały „Wprowadzenie” (str. 21-23) i „Część literaturowa” (str.27-80) Pani mgr Paulina Maria Materna dokonała w ujęciu chronologiczno-aplikacyjnym przeglądu aktualnego piśmiennictwa, który dotyczył między innymi:

- syntezy i charakterystyki analitycznej czwartorzędowych soli amoniowych ze szczególnym uwzględnieniem reakcji Menschutkina i jej modyfikacji, która została wykorzystana do syntezy tri- i tetramerycznych czwartorzędowych soli amoniowych,

- właściwości fizykochemicznych czwartorzędowych soli amoniowych oraz spektroskopowych metod analitycznych stosowanych do badania ich struktury t.j. widm w podczerwieni FTIR z transformacją Fouriera, widm magnetycznego rezonansu jądrowego ^1H NMR, C^{13} NMR, które umożliwiają potwierdzenie struktury zsyntetyzowanej pochodnej,
- wykorzystanie chromatografii cienkowarstwowej (TLC) do rozdzielania i badania składu produktów reakcji (str. 47-49).

Znaczącym literaturowo dla celu pracy jest segment dysertacji poświęcony aktywności powierzchniowej czwartorzędowych soli amoniowych – QAS (str.50-59) i ich mechanizmowi działania przeciwdrobnoustrojowego (bójczego). W zaprezentowanym zestawieniu Tabela 11 (str. 64) Pani mgr Paulina Maria Materna omawia efektywną działalność przeciwdrobnoustrojową związaną z ilością atomów węgla w rodniku lipofilowym.

Jednocześnie wskazuje na fakt, że aktywność bójcza i biostatyczna czwartorzędowych soli amoniowych jest związana z obniżeniem liczbowej wartości krytycznego stężenia micelnego (cmc), (str. 65).

Przegląd „Części literaturowej” kończą rozdziały dotyczące biodegradacji (str. 66-70), właściwości antykorozyjnych surfaktantów z klasy czwartorzędowych soli amoniowych (str. 70-72) oraz ich zdolności pianotwórczych, emulgujących i solubilizujących (str. 73-76). Dopelnieniem oryginalnego i spójnego merytorycznie przeglądu piśmiennictwa dotyczącego surfaktantów z klasy czwartorzędowych soli amoniowych jest segment (rozdział) poświęcony współczesnym kierunkom ich aplikacji.

Z należyłą satysfakcją należy podkreślić fakt, że Pani mgr Paulina Maria Materna bardzo starannie, z zachowaniem chronologii przedstawiła nie tylko metody ich syntezy, określenia tożsamości strukturalnej lecz także ich aktywność powierzchniową w zależności od struktury segmentu lipofilowego w cząsteczce a przede wszystkim ich właściwości bójcze w stosunku do wybranych szczepów bakteryjnych.

Zaletą zaprezentowanego przeglądu piśmiennictwa w „Części literaturowej” jest znakomita dokumentacja (zestawienia tabelaryczne, ryciny) związana z właściwościami aplikacyjnymi i strukturą czwartorzędowych soli amoniowych a także wiarygodne przedstawienie reakcji ich otrzymywania.

Sądzę również – po gruntownej analizie części teoretycznej rozprawy doktorskiej, że Doktorantka zbyt lakonicznie potraktowała zagadnienie związane z toksycznością surfaktantów z klasy czwartorzędowych soli amoniowych a także specyfikę interakcji (niezgodność ?), których przebieg ogranicza zakres ich stosowania w technologii postaci leku i kosmetyku a także jako składowych preparatów do dezynfekcji skóry.

1. Cel pracy i zakres tematyczny jego realizacji

Z przeprowadzonej szczegółowej analizy dostępnego piśmiennictwa dotyczącego czwartorzędowych soli amoniowych, którą przeprowadziła Doktorantka Pani mgr Paulina Maria Materna w rozdziale „Część literaturowa” a która stanowi część teoretyczną dysertacji wynika, że dała ona asumpt do syntezy nowej oryginalnej klasy czwartorzędowych soli amoniowych opartej na łączniku (rdzeniu) benzenowym i łańcuchach alkilowych o zawartości atomów węgla od 4 do 18-nastu.

W aplikacyjnym segmencie zaplanowanych badań przez Doktorantkę mieszczą się zadania związane z opracowaniem powtarzalnej i wydajnej metody syntezy di-, tri- i tetramerycznych alkiloamoniowych pochodnych akrylowych, ustalenie ich tożsamości oraz struktury krystalicznej i supramolekularnej.

Aplikacyjnym uzupełnieniem syntetycznego segmentu badań stanowi ocena aktywności powierzchniowej nowej klasy pochodnych uzupełniona o wyznaczenie minimalnego stężenia hamującego (MIC) i ocena ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej.

Warstwa poznawcza dysertacji wskazuje na możliwość potencjalnej aplikacji nowej klasy jonowych surfaktantów w szeroko rozumianej technologii postaci leku i kosmetyku. Zakres pracy doktorskiej został przez Panią mgr Paulinę Marię Materna szczegółowo omówiony w rozdziale „Cel pracy” (str.83-84).

Dokonując – z obowiązku recenzenta, reasumpcji zaprojektowanego segmentu badań od syntezy po preformulacyjną aplikację stwierdzam, że temat rozprawy doktorskiej dał szansę Doktorantce nie tylko zaprezentowania współczesnego warsztatu naukowo-badawczego i wszechstronnego przygotowania do pracy naukowej lecz także wskazał na daleko idącą Jej samodzielność w realizacji segmentu preparatywnego i analitycznego wraz z edycją dysertacji.

2. Dobór materiałów i metod badawczych

Pochodzenie substratów zestawionych na liście odczynników (str.153) a przede wszystkim opisy procedur syntezy nowej klasy jonowych surfaktantów, jak również postępowanie analityczne zostało dobrze udokumentowane (str. 154-161).

Przedstawione postępowanie związane z oceną aktywności powierzchniowej a w tym wyznaczenie krytycznego stężenia micelnego (cmc) oraz minimalnego stężenia hamującego (MIC) spełnia wymogi farmakopealne (FP X, Pharm. Europ.) i odpowiednie standardy publikacyjne.

Tak więc dobór metod syntezy nowych surfaktantów i zastosowanych do identyfikacji technik analitycznych należy uznać za trafny a opisy procedur są wyczerpujące i wiarygodne przez co wystawiają Doktorantce bardzo dobre świadectwo.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Pani mgr Paulina Maria Materna postawiła przed sobą bardzo ambitny cel naukowy obarczony ryzykiem i tzw. „niespodziankami syntetycznymi” podzielony na odpowiednie segmenty realizacyjne. W pierwszym z nich według załączonego schematu (str. 87) przeprowadzono syntezę oligomerycznych soli alkiloamoniowych z łącznikiem aromatycznym.

Doktorantka omawiając problemy preparatywne wskazuje na rolę acetonu w wydzieleniu pochodnych. Zwraca uwagę na fakt, że przy krótszych łańcuchach hydrofobowych w strukturze czwartorzędowych soli jego wprowadzenie – w odpowiedniej ilości, nie spowodowało wypadania osadu. W sytuacji, gdy produkt reakcji miał postać oleju lub wosku w preparatyce pochodnych korzystano z eteru dietylowego oraz z mieszaniny acetonu z metanolem.

Przebieg etapów syntezy oligomerycznych soli alkiloamoniowych z łącznikiem aromatycznym (di-, tri-, i tetra) został udokumentowany danymi międzyoperacyjnymi (str.87-92) a podstawowe wielkości fizykochemiczne charakteryzujące ich strukturę zestawiono w tab. 16 (str.93). Na ryc.6 (str. 94) Doktorantka przedstawiła interesującą zależność między ilością węgla w łańcuchu hydrofobowym alkiloamoniowych pochodnych arylowych a ich temp. topnienia ($^{\circ}\text{C}$) z której wynika nieoczekiwany brak symetryczności tej wielkości między strukturami QSB 3-n i QSB 4-n.

W komentarzu do preparatywnej części badań Doktorantka stwierdza, że otrzymane pochodne topią się w zakresie 201-234 $^{\circ}\text{C}$ powyżej której ulegały pirolizie.

Z przeprowadzonej analizy UV-Vis wynika, że cyt. „długość łańcucha alkilowego nie ma znaczącego wpływu na położenie maksimum absorpcji” a dalej Doktorantka wyjaśnia co jest powodem takiego stanu rzeczy (str.95, tab. 17).

Precyzyjnie i profesjonalnie przeprowadzona analiza porównawcza widm w podczerwieni (widma FTIR)(rozdział 2.1.2., str.96-100) umożliwiła Doktorantce na dokonanie istotnej identyfikacji pochodnych – stwierdza bowiem, że w strukturach zsyntezowanych pochodnych znajdują się oczekiwane grupy funkcyjne.

Kontynuując analizę spektroskopową widm protonowego $^1\text{H NMR}$ i węglowego $^{13}\text{C NMR}$ magnetycznego rezonansu jądrowego Doktorantka poprzez ocenę liczbowej wartości przesunięć protonów zestawionych w tab. 19, 20, 21 oraz w tab. 23, 24, 25 ustaliło definitywnie strukturę pochodnych soli di-, tri- i tetra alkiloamoniowych. Wykonane alternatywne widma korelacyjne dwuwymiarowej spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego COSY oraz HSQŚ potwierdziły zdaniem Doktorantki „zgodność przypisania wartości przesunięć chemicznych pochodzących od poszczególnych atomów obserwowanych w widmach $^1\text{H NMR}$ i $^{13}\text{C NMR}$ ”.

Dopełnieniem podstawowych badań poznawczych nad budową zsyntetyzowanych pochodnych przeprowadzonych przez Doktorantkę była zaprojektowana analiza krystalograficzna pochodnych di- (QSB2-12) i tetrabromku (QSBA-12), których dane zestawiono w tab. 26 i 27 a strukturę przestrzenną (topologię cząsteczki) wyznaczono posługując się programem SHELXS 97.

Z geometrii wiązań wodorowych wynika, że stabilizują one układ konformacyjny wraz z cząsteczką wody (dipol) i słabymi siłami Van der Waalsa. Natomiast struktura supramolekularna dibromku jest konsekwencją silnych oddziaływań elektrostatycznych (ryc. 33, str. 124) między anionami bromkowymi i kationami amoniowymi, które wraz z lipofilowymi podstawnikami pochodnych zamykają topologicznie dipol cząsteczki wody. Powyższe dotyczy również supramolekularnej struktury tetrabromku z tym, że w podstawniku dodecylovym Doktorantka zaobserwowała „wzrastające wymiary elipsoid drgań termicznych”.

Doktorantka kończy wyjątkowo trudny i skomplikowany interpretacyjnie segment badań spektroskopowych oszacowaniem z użyciem metody PM5 trwałości (~ jakiej ?) zsyntetyzowanych oligomerycznych soli alkiloamoniowych (str. 126-129, tab.30).

Wyliczone liczbowe wartości molowego ciepła tworzenia (ΔG_m^o , ΔHOF – kcal/mol) umożliwiły zaprezentowanie wybranych homologicznych struktur pochodnych, pozwoliły również na wyjaśnienie związku liczbowej wartości HOF(kcal/mol) z wzrastającą liczbą podstawników w pierścieniu benzenowym.

Aplikacyjny segment rozprawy doktorskiej zamyka rozdział poświęcony aktywności powierzchniowej i biologicznej otrzymanych alkiloamoniowych pochodnych arylowych.

Krytyczne stężenie micelarne – co wynika z treści rozprawy, zostało wyznaczone już to metodą miareczkowania konduktometrycznego w temp., 50°C (~ ze względu na niską rozpuszczalność pochodnych) już to metodą spektrofluorometryczną a także metodą potencjometryczną korzystając z bromkowej elektrody jonoselektywnej (współpraca z Institute of Advanced Chemistry of Catalonia).

Uzyskane rezultaty krytycznego stężenia micelnego (cmc) i termodynamicznego potencjału tworzenia miceli (ΔG_m^o), które zestawiono w tab. 31 (str.130) i w tab. 32 (str.135) dały Doktorantce asumpt do oszacowania związku między aktywnością powierzchniową a stopniem oligomeryzacji. Z przeprowadzonej przez Doktorantkę analizy metod wyznaczania krytycznego stężenia micelnego (cmc) wynika, że metoda spektrofluorometryczna jest wyjątkowo użyteczna ze względu na problem rozpuszczalności pochodnych w wodzie (pomiar w niskich stężeniach surfaktanta). Minimalne stężenie hamujące (MIC) wzrost bakterii i grzybów zostały wyznaczone standardową metodą dwukrotnego rozcieńczenia w Instytucie Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej. Opis procedury został zamieszczony na str.163 rozprawy doktorskiej. Z zestawionych w tab. 33 (str. 138) liczbowych wartościach MIC i komentarzu Doktorantki wynika, że krótsze łańcuchy węglowodorowe w pochodnych dibromków nie są zdolne do dyfuzji (infiltracji) przez ścianę komórkową. Najwyższą aktywnością przeciwdrobnoustrojową charakteryzują się dibromki, które w łańcuchu alkilowym zawierają od 10 do 12 atomów węgla; wydłużenie łańcucha w łańcuchu alkilowym powoduje obniżenie skuteczności bójczej (istotny wzrost wartości MIC).

W rozdziale „Podsumowanie i Wnioski” (str.145-150) Doktorantka Pani mgr Paulina Maria Materna dokonała merytorycznej reasumpcji przeprowadzonych badań i uzyskanych rezultatów. Istotną częścią tego rozdziału jest zestawienie komunikatów zjazdowych i publikacji na których materiał zawarty w recenzowanej rozprawie doktorskiej był prezentowany – łącznie 19 pozycji (str.148-150).

4. Ocena strony redakcyjnej

Rozprawa doktorska pod względem stylistycznym napisana jest niezwykle starannie. Oryginalnie, interesująco i niezwykle sugestywnie została opracowana strona graficzna i dokumentacyjna pracy doktorskiej.

Pod względem redakcyjnym ma ona nietypowy układ, który przypomina publikację naukową; i tak pracę doktorską poprzedza streszczenie w języku polskim i angielskim a kończą procedury części eksperymentalnej. Doceniam ogromną pracę włożoną przez Doktorantkę w zebraniu i merytorycznym opracowaniu piśmiennictwa, które było inspiracją do badań naukowych (bibliografię pracy doktorskiej stanowi 281 pozycji literaturowych). Dostrzeżone drobne uchybienia w komentarzu do przeprowadzonych segmentów badań są bez znaczenia dla merytorycznej wartości pracy.

Sądzę, że pod względem redakcyjnym przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia wymagania ustawowe i zwyczajowe stawiane przez środowisko akademickie rozprawom doktorskim.

5. Uwagi o charakterze dyskusyjnym

Pani mgr Paulina Maria Materna w swojej oryginalnej i interdyscyplinarnej pracy poświęconej nowej klasie surfaktantów bromków czwartorzędowych soli amoniowych opartych na pierścieniu benzenowym potwierdziła wszechstronnymi badaniami ich strukturę oraz aktywność powierzchniową i przeciwdrobnoustrojową.

Ośmielam się jednak – mając na względzie aspekt aplikacyjny związany z technologią postaci leku zadać Pani Doktorantce następujące pytania.

- W części syntetycznej rozprawy doktorskiej na str.93 zamieściła Pani w tab. 16 temp.topnienia (w °C) pochodnych i ich wzór sumaryczny, który jest konsekwencją ustalenia szczegółowej struktury di-, tri- i tetra alkilowej pochodnej czwartorzędowych soli amoniowych w formie bromku. Wyżej wymienione parametry umożliwiają korzystając z ogólnej teorii rozpuszczalności Hildebranda-Scatcharda-Fedorsa wyliczenie przewidywanej rozpuszczalności rzeczywistej w formie ułamka molowego ($-\log x_2$), który można wyrazić (przeliczyć) również do stężenia mol/dm³.

W tekście rozprawy doktorskiej używa Pani określenia cyt.”...rozpuszczalność pochodnych arylowych w wodzie jest bardzo niska ze względu na dużą hydrofobowość cząsteczek i maleje wraz ze wzrostem długości łańcucha...”. Nie wyliczyła Pani parametru

rozpuszczalności, nie określiła Pani również poziomu równowagi hydrofilo-lipofilowej (HLB) skąd więc to ilościowe porównanie do struktury pochodnych ?

- Współczynnik napięcia powierzchniowego wody γ_{H_2O} w temp. 50°C wynosi 67,94 mJ/m². Czy mogłaby Pani podać – mając na uwadze aplikację pochodnych liczbową wartość współczynnika napięcia powierzchniowego γ_{roz}^{37} (mJ/m²) roztworu nasyconego w temp. 37°C i w obszarze krytycznym γ_{cmc}^{37} ?

- Co było powodem rezygnacji z metody wyznaczania współczynnika napięcia powierzchniowego zalecanego dla surfaktantów przez Polską Normę (PN) ?

Konkluzja

Na podstawie argumentów przedstawionych w poprzednich rozdziałach recenzji uważam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalna i interdyscyplinarna, w której Pani mgr Paulina Maria Materna dowiodła, że potrafi samodzielnie zaprojektować, przeprowadzić zaplanowane badania i zinterpretować uzyskane rezultaty. A ponadto posiada znaczny zasób wiedzy z nauk pokrewnych chemii i wiedzy praktycznej niezbędnej współczesnemu pracownikowi naukowo-dydaktycznemu.

Uważam ponadto, że praca spełnia wymagania stawiane przez Ustawę o Stopniach i Tytule Naukowym z zakresu sztuki z dnia 14 marca 2003r. (Dz.U. Nr 65, poz.595 ze zm. Dz.U. z 2005r. nr 165, poz.1365) a także Rozporządzenia Wykonawczego do Ustawy z dnia 15.01.2004r. (Dz.U. 04.15.128) dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Pauliny Marii Materna do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Lodz. 29.05.2017

prof. zw. dr hab. n. farm. Marian Mikolaj Zgoda
Marian Mikolaj Zgoda