

Prof. zw. dr hab. n. farm. Marian Mikołaj Zgoda
Zakład Technologii Postaci Leku
Katedra Farmacji Stosowanej
Uniwersytetu Medycznego w Łodzi

Recenzja

rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianny Szulc
p.t.
„Synteza i właściwości fizykochemiczne podwójnych soli alkilogłucityloamoniowych”

Recenzowana praca doktorska została zrealizowana
w Pracowni Chemii Mikrobiocydów Wydziału Chemii
Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Współczesna technologia kropli do oczu tak w wydaniu wielkoprzemysłowym jak i w recepturze aptecznej – niezależnie od fizykochemicznej postaci preparatu (roztwór rzeczywisty, zawiesina emulsja lub maść) wkraplanej lub wprowadzonej do worka spojówkowego zgodnie z wymaganiami Farmakopei Polskiej (FP V-VIII) i Europejskiej (Pharm. Eur. VI-VIII) a także FDA zaleca aby zawierały one środek konserwujący, który przy wielodawkowej formie zapewnia komfort farmakoterapeutyczny spełniając tym samym fundamentalny warunek tzw. trwałości praktycznej postaci leku.

Wprowadzenie w obszar farmakologii skóry i dermokosmetyki fitozwiązków zawartych wraz z balastem w suchych mianowanych ekstraktach roślinnych wymaga wprowadzenia środków, które przy zachowaniu ich szerokiego spektrum działania bakterio – i grzybobójczego, posiadałyby działanie nawilżające i solubilizacyjne przy stosunkowo niskich właściwościach pianotwórczych.

Jest zasadą formułacyjną, że konserwanty muszą chronić przede wszystkim fazę wodną emulsji i rozpuszczone w niej środki lecznicze a przede wszystkim przenikać przez błonę lipidową mikroorganizmów.

Wprowadzenie do składu recepturowego produktu farmaceutycznego lub kosmetycznego środka konserwującego reguluje określone ustawodawstwo.

Współcześnie nie dysponujemy idealnym, uniwersalnym środkiem konserwującym i z tego powodu zalecenia farmakopealne sugerują aby stosować je w zestawach. W Farmakopei Polskiej (FP V-VIII) w zalecanych zestawach znajduje się między innymi chlorek benzalkoniowy.

Zasadniczym problemem współczesnej konserwacji i solubilizacji w technologii preparatów farmaceutycznych i kosmetycznych jest rząd wielkości krytycznego stężenia micelnego (cmc) oraz wielkość najmniejszego stężenia hamującego (MIC) a także postulat Rosena tj. takie stężenie surfaktanta (konserwanta), przy którym obniżenie napięcia powierzchniowego nie przekroczy granicy fizjologicznej 52-48 mJ/m² (- o 20 jednostek mniej w stosunku do $\gamma_{H_2O}^{25} = 71,98 \text{ mJ} / \text{m}^2$).

Tak więc już we „Wstępie” Pani mgr Adrianna Szulc w jasny i czytelny sposób nakreśliła cel i zakres zaprojektowanych badań nad podwójnymi czwartorzędowymi solami amoniowymi, które połączone łącznikiem (spacerem), stają się klasą surfaktantów typu

„gemini” ze wszystkimi już rozpoznanymi typowymi zaletami aplikacyjnymi dla tego typu struktur.

Praca została wykonana w Pracowni Chemii Mikrobiocydów Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod promotorską opieką Pana Prof. UAM dr hab. Bogumiła Bryckiego, który to w „iście aptekarski sposób” wypłynął na starannie zredagowaną i aplikacyjnie udokumentowaną formę rozprawy doktorskiej.

W części teoretycznej rozprawy doktorskiej Pani mgr Adrianna Szulc dokonała – w ujęciu aplikacyjnym przeglądu aktualnego piśmiennictwa, który dotyczył między innymi;

- syntezy i budowy czwartorzędowych soli alkiloamonowych, soli amoniowych z grupą hydroksyetylową wraz z ich przemysłową syntezą do której wykorzystano odnawialną bazę kwasów tłuszczowych,
- syntezy i uwarunkowań strukturalnych podwójnych czwartorzędowych soli alkiloamonowych oraz ich postaci wielokrotnych,
- syntezy i fizykochemicznych właściwości surfaktantów typu gemini z symetrycznym układem alkoholi cukrowych wraz z wybranymi elementami analizy spektroskopowej (UV-VIS, $^1\text{H-NMR}$),
- wykorzystania metod chromatograficznych (m.TLC, m.HPLC) do rozdzielania mieszanin (produkt po syntezie).

Istotnym dla profilu aplikacyjnego rozprawy doktorskiej jest podkreślenie w omówieniu tych parametrów, które decydują o aktywności powierzchniowej soli alkiloamonowych i ich struktur podwójnych ze szczególnym uwzględnieniem wpływu liczby atomów węgla w podstawniku alkilowym na rząd wielkości krytycznego stężenia micelnego (cmc).

Ten niezwykle starannie i metodycznie przeprowadzony przegląd klas surfaktantów zamyka rozdział dotyczący struktur „gemini” a w tym technik wykorzystania ich miceli do transferu genów wraz z powszechnie stosowaną metodyką do oszacowania ich aktywności przeciwdrobnoustrojowej i biodegradacji.

Panoramyczny – z uwzględnieniem modyfikacji strukturalnych, sposób prezentacji aktualnego piśmiennictwa dotyczącego klas omawianych typów surfaktantów a także jego reasumpcja dotycząca oceny właściwości bójczych (konserwujących) przy precyzyjnym, aktualnym i merytorycznie zasadnym doborze literatury źródłowej (str. 187-207,232 pozycje piśmiennictwa) dowodzą bardzo dobrego przygotowania Doktorantki do podjęcia realizacji zaplanowanych prac badawczych.

Z należytą satysfakcją należy podkreślić fakt, że Pani mgr Adrianna Szulc bardzo starannie, z przesłaniem dydaktycznym przedstawiła nie tylko technikę wytwarzania omawianych klas surfaktantów (od pojedynczych zasad czwartorzędowych do ich struktur typu gemini) lecz także mechanizm i warunki ich biodegradacji.

Zaletą zaprezentowanego omówienia jest podkreślenie przydatności czwartorzędowych soli amoniowych do konserwacji i dezynfekcji przestrzeni i pomieszczeń zabiegowych a także wskazanie, że ich aktywność bójcza jest związana z $\log P$ (współczynnik podziału n-oktanol/woda), który jest jedną z form charakteryzujących równowagę hydrofilo-lipofilową (HLB) cząsteczki surfaktanta.

Sadzę również – po gruntowej analizie tekstu, że Doktorantka zbyt lakonicznie w zaprezentowanym omówieniu potraktowała zagadnienie związane z kryterium wyboru związku konserwującego i ich interakcjami (niezgodnościami) farmaceutycznymi, których specyfika kliniczna ogranicza zakres ich stosowania w szeroko rozumianej medycynie zabiegowej, kosmetologii i farmacji (technologia postaci leku).

1. Dobór tematu i zakres pracy doktorskiej

Z omówienia sekwencji tematycznej, która stanowi część wstępną mojej recenzji wynika, że podjęcie prac nad syntezą podwójnych soli z modułem alkiloglucityloamoniowym wraz z pełną analizą spektroskopową ich struktury, uzupełnioną oceną fizykochemiczną (- w opcji aplikacyjnej) produktu uważam za bardzo ważne i interesujące z naukowego i praktycznego punktu widzenia.

W aplikacyjnym segmencie zaplanowanych badań przez Panią mgr Adriannę Szulc mieszczą się zadania związane z oszacowaniem aktywności powierzchniowej i profilu bójczego surfaktantów w stosunku do standardowych szczepów bakteryjnych wg FP V-VIII a także zbadanie podatności nowej klasy pochodnych typu gemini na tlenową biodegradację.

Tak więc temat rozprawy doktorskiej uważam za właściwy i „na czasie” a jego warstwa poznawcza wskazuje na możliwość potencjalnej aplikacji nowej klasy surfaktantów typu gemini w szeroko rozumianej technologii postaci leku i kosmetyku.

Zakres pracy doktorskiej został przez panią mgr A. Szulc szczegółowo omówiony w rozdziale „Cel pracy” (str. 83-84).

Dokonując – z obowiązku recenzenta, reasumpcji zaprojektowanego profilu badań stwierdzam, że temat rozprawy doktorskiej dał szansę Doktorantce wykazania się, że jest nie

tylko wszechstronnie przygotowana do pracy naukowo-badawczej, lecz także potrafi samodzielnie zrealizować segment preparatywny i analityczny wraz z edycją dysertacji.

2. Dobór materiałów i metod badawczych

Pochodzenie substratów zestawionych na liście odczynników (str. 157) a przede wszystkim opisy procedur syntezy nowej klasy surfaktantów jak również postępowanie analityczne zostało dobrze udokumentowane.

Przedstawione postępowanie oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej (wyznaczenie MIC) oraz techniki wyznaczenia krytycznego stężenia micelnego (cmc) spełnia wymagania farmakopealne i odpowiednie standardy publikacyjne.

Tak więc dobór metod syntezy i technik analitycznych należy uznać za trafny, a opisy procedur (Część eksperymentalna, str. 157-184) są wyczerpujące i wiarygodne (podane struktury surfaktantów) przez co wystawiają Doktorantce bardzo dobre świadectwo.

3. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Pani mgr Adrianna Szulc postawiła przed sobą bardzo ambitny cel naukowy podzielony na odpowiednie segmenty realizacyjne. W pierwszym z nich otrzymano polimetyleno- α , ω -bis (N-glukozaaminy) w wyniku znanej w piśmiennictwie reakcji 1,2-,1,4- i 1,6-diamin z D (+) glukozą. Następnie poprzez redukcję borowodorkiem sodu i rozkładzie jego nadmiaru kwasami beztlenowymi (H_2F_2 , HCl, HBr) otrzymano sole halogenków z modułem N-deoksyglucityloamoniowych.

Kolejnym etapem syntezy surfaktantów typu gemini było przyłączenie podstawników alkilowych do atomów azotu poprzez redukcyjne aminowanie aldehydów aminami otrzymanymi „in situ” z ich dichlorków.

Przebieg powyższych etapów syntez został przedstawiony na ryc. 46 i 47 (str. 91-92) i udokumentowany danymi międzyoperacyjnymi zestawieniami w tab. 23, 24, 25 i 26 (str. 88-93).

Doktorantka omawiając uzyskane produkty stwierdziła, że „z uwagi na dużą zawadę przestrzenną – krótki łącznik struktury 1,2 – diaminy nie zaobserwowano reakcji podstawienia”, natomiast zsyntetyzowano zaplanowane struktury dla łącznika pochodzącego od 1,4- i 1,6-diaminy.

Powyższy proces został udokumentowany rezultatami analizy elementarnej i przebiegiem zależności między temperaturą topnienia – t_{top} ($^{\circ}C$) w funkcji ilości atomów węgla – Σn (C) w podstawniku alkilowym; $t_{top} (^{\circ}C) = f(\Sigma n(c))$.

Ostatnim etapem syntezy surfaktantów typu gemini z podstawnikiem zawierającym alkohole cukrowe było czwartorzędowanie jodkiem alkilowym wg reakcji Menschutkina.

Syntezę w/w pochodnych diiodków zaprezentowała Doktorantka na ryc. 49 podając w legendzie ilość atomów węgla w rodniku R i R', natomiast wybrane wielkości fizykochemiczne wraz z analizą elementarną zostały zestawione w tab. 28 (str. 97).

W komentarzu do procesu czwartorzędowania Doktorantka stwierdza, że wydłużenie czasu reakcji wiąże się z degradacją produktów i jednocześnie podaje, że produkty są związkami o bardzo niskiej rozpuszczalności rzeczywistej i nie topią się lecz ulegają pirolizie (zbrązowienie próbki).

Analizie spektroskopowej ^1H NMR zostały poddane otrzymane podczas etapowej syntezy: bis (N-glukozaminy) i ich sole oraz dioctany i diiodki odpowiednich pochodnych.

Wykorzystując program GAUSSIAN 03 wykonano dla dichlorku – 1,4-bis (str. 104, tab. 32) obliczenia przesunięć chemicznych protonów i stałych ekranowania, których liczbowe wartości porównano z oznaczeniami w D_2O . Dla struktury np. GZ4Cl przebieg zależności między przesunięciami chemicznymi (δ_{exp}) i obliczonymi stałymi ekranowania ($\sigma_{\text{cal.}}$) ma charakter równania prostej typu $y = a + bx$.

Przy niewielkich zmianach w przesunięciach chemicznych analogicznych protonów, które odnotowuje Doktorantka dla diiodków i dioctanów przebieg powyższej zależności będzie w istotny sposób analogiczny.

Analiza widm ^{13}C NMR uzupełnia segment badań strukturalnych, który wskazuje na wpływ ładunku na atomie azotu na kierunek przesunięć sygnałów pochodzących od atomów „C” (~ku niższym wartościom ppm).

Precyzyjnie i profesjonalnie przeprowadzona porównawcza analiza widm w podczerwieni, (Rozdział 23, str. 125-136) umożliwiła Doktorantce między innymi oszacowanie mocy wiązania wodorowego dla odpowiednich soli z kwasami halogenowodorowymi, co pozwala określić potencjalny profil rozpuszczalności (układ zbliżony do solubilizacji hydrotropowej).

W następnym etapie pracy Doktorantka przeprowadziła kompleksową analizę krystalograficzną struktury GZ4Cl z której wynika, że w fazie stałej układ konformacyjny cząsteczki jak i struktura supramolekularna „jest stabilizowana rozległą siecią wiązań wodorowych (tab. 46) i szeroko rozumianych oddziaływań elektrostatycznych. Ten stan rzeczy sprawia, że kryształ dichlorku GZ4Cl (str. 139) „jest zorganizowany w hydrofilowe segmenty”.

W konsekwencji przeprowadzonych badań krystalograficznych Doktorantka stwierdza, że w pojedynczej cząsteczce oddziaływania (- co zrozumią) wewnątrzcząsteczkowe są silniejsze i cały dikation przyjmuje konformację zbliżoną kształtem do litery „S” (ryc. 75, str. 141).

Mając na uwadze potencjalną kwalifikację zsyntetyzowanych surfaktantów typu gemini jako substancji pomocniczych o działaniu bójczym zostały wyznaczone najmniejsze stężenia hamujące (MIC) dla zalecanych przez Farmakopeę Polską (FP VIII) szczepów bakterii i grzybów. Aktywność drobnoustrojową MIC w $\mu\text{g/ml}$ zestawiono w tab. 48 (str.142).

Powyższy segment badań w warstwie merytorycznej jest kompatybilny z oznaczonym krytycznym stężeniem micelarnym (cmc), którego liczbowe wartości zestawiono w tab. 49 (str. 144).

W omówieniu w/w segmentów badań Doktorantka stwierdza, że „wprowadzenie do struktury glukozaminy podstawników alkilowych powoduje radykalne zwiększenie aktywności przeciwdrobnoustrojowej. Dijodki – 1,6 - bis (NN-dialkilo-) są niezwykle skuteczne w stosunku do bakterii i grzybów.

Z powyższym koresponduje stwierdzenie Doktorantki, że „otrzymane wyniki świadczą o znakomitej aktywności powierzchniowej diiodków, o wartości cmc są blisko trzy rzędy wielkości mniejsze w stosunku do referencyjnej struktury DTAB (15 mmol/dm^3).

Segment aplikacyjny rozprawy doktorskiej zamyka rozdział 6 poświęcony biodegradacji otrzymanych związków. Z danych zestawionych w tab. 50 (str. 146) wynika, że niską podatnością na biodegradację charakteryzują się związki, w tym i diiodki które wyróżnia duża aktywność przeciwdrobnoustrojowa.

W podsumowaniu Doktorantka dokonała merytorycznej reasumpcji przeprowadzonych badań i uzyskanych rezultatów.

4. Ocena strony redakcyjnej

Rozprawa doktorska pod względem stylistycznym napisana jest starannie. Bardzo dobrze i interesująco została opracowana strona graficzna i dokumentacyjna pracy doktorskiej. Pod względem redakcyjnym ma ona nietypowy układ (mam wrażenie, że przypomina publikację naukową), którego emanacją jest zestawiona w końcowym rozdziale (VI) część eksperymentalna. Dostrzeżone drobne uchybienia są bez znaczenia dla merytorycznej wartości pracy. Sadzę, że pod względem redakcyjnym przedstawiona do recenzji praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

5. Uwagi o charakterze dyskusyjnym

Doktorantka w swej oryginalnej i interdyscyplinarnej pracy poświęconej nowej klasie surfaktantów typu „gemini” potwierdziła, że otrzymane przede wszystkim diiodki charakteryzują się oczekiwaną aktywnością powierzchniową i przeciwdrobnoustrojową w stosunku do struktur referencyjnych. Ośmielam się – mając na względzie aspekt aplikacyjny zadać Pani Doktorantce następujące pytania.

Czy nie byłoby właściwe przy ocenie właściwości aplikacyjnych nowej klasy surfaktantów (konserwacja) porównanie liczbowych wartości MIC ($\mu\text{g/ml}$) z krytycznym stężeniem micelarnym (cmc w mmol/dm^3).

Jaką liczbową wartość napięcia powierzchniowego γ_{cmc}^{25} w obszarze krytycznym odnotowała Pani dla wodnych roztworów nowej klasy surfaktantów? Jak odległa była jej wartość w stosunku do fizjologicznej wartości – γ płynów ustrojowych?

6. Konkluzja

Na podstawie argumentów przedstawionych w poprzednich rozdziałach uważam, że przełożona do oceny rozprawa doktorska jest oryginalna i interdyscyplinarna, w której Pani mgr Adrianna Szulc dowiodła, że potrafi prowadzić badania naukowe, a także posiada znaczny zasób erudycji 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 oraz Stopniu i Tytule Naukowym z zakresu sztuki (Dz. Ust. 03.65.595) a także Rozporządzenia Wykonawczego do Ustawy z dnia 15.01.2004- Dz. Ust. 04.15.128 dlatego stawiam wniosek o dopuszczenie Pani mgr Adrianny Szulc do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

prof. zw. dr hab. n. farm. Marjan ~~Nikolaj~~ Zgodzi
Chemia ~~Nikolaj~~ Zgodzi