



**GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY**

**Katedra Biofarmacji  
i Farmakodynamiki**

**MEDICAL UNIVERSITY OF GDAŃSK**

**Department of Biopharmaceutics  
and Pharmacodynamics**

tel. (48)(58) 3491493 fax: (48)(58) 3493262

ul. Gen. J. Hallera 107, PL 80-416 Gdańsk

Gdańsk, 2016-11-28

### **Recenzja**

**rozprawy doktorskiej mgr PAULINY FURMANIAK zatytułowanej**

**„Elektroforeza kapilarna związków aktywnych biologicznie z wykorzystaniem zateżenia w układzie pomiarowym”**

Elektroforeza kapilarna, podstawowy przedstawiciel technik elektromigracyjnych, pozwala na szybkie i wysoce wydajne rozdzielanie naładowanych elektrycznie składników mieszanin w stosunkowo małych objętościach próbki. Początek rozwoju technik elektromigracyjnych datuje się na drugą połowę XIX wieku kiedy to angielski fizyk Oliver Lodge opublikował wyniki pierwszych eksperymentów elektromigracyjnych w roztworach i żelach. W 1948 roku szwedzki biochemik Arne Wilhelm Kaurin Tiselius został laureatem Nagrody Nobla z chemii, za m.in. badania nad zjawiskami elektroforezy oraz adsorpcji. Stellan Hjerten, uczeń Arne Tiseliusa, w 1967 roku zaproponował zastosowanie kapilar o bardzo małych średnicach wewnętrznych co stało się początkiem współcześnie znanej elektroforezy kapilarnej, a w 1984 roku ukazała się pionierska praca japońskiego badacza Shigeru Terabe proponująca elektroforetyczne rozdzielanie, poza związkami obdarzonymi

ładunkiem, także obojętnych elektrycznie cząsteczek, z użyciem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (*micellar electrokinetic chromatography*). Tylko publikacje tego ostatniego wymienionego powyżej naukowca, m.in. w takich czasopismach jak *Science*, osiągnęły w literaturze światowej liczbę ponad 17,5 tysięcy cytowań a ich skumulowany współczynnik oddziaływania wynosi 70 (wg bazy Web of Science). Świadczy to niezbicie o bardzo dużym zainteresowaniu badawczym technikami elektromigracyjnymi a także o istotnym potencjale innowacyjnym jaki za nimi stoi. Jednym z takich wyzwań poznawczych, które przyciąga uwagę wielu badaczy w tym Autorkę recenzowanej dysertacji, jest najpoważniejsza prawdopodobnie wada technik elektromigracyjnych jaką stanowi stosunkowo niska, zwłaszcza w porównaniu do technik chromatograficznych, czułość analityczna. Spośród wielu podejść badawczych stosowanych do rozwiązania tego istotnego ograniczenia analitycznego, szczególnie miejsce zajmują szeroko rozumiane techniki wzbogacania analitu w kapilarze, tzw. *on-line preconcentration techniques*. Zbadanie zjawisk fizykochemicznych zachodzących w kapilarze pod wpływem przykładanego napięcia oraz ich wpływ na wielkość sygnału elektroforetycznego, jak również opis mechanizmów stosowanych technik wzbogacania analitu w kapilarze, ze szczególnym uwzględnieniem parametrów krytycznych zachodzących procesów stały się przedmiotem pracy doktorskiej mgr Pauliny Furmaniak.

Oceniana praca doktorska wykonana została pod kierunkiem dr. hab. Rafała Głowackiego w Katedrze Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego i jest doskonałym przykładem kompleksowego podejścia do badań złożonych procesów analitycznych. Praca stanowi kontynuację prowadzonych w Katedrze badań oraz wpisuje się w dorobek dokonań Zespołu związanych z technikami elektromigracyjnymi. Rezultaty badań ujęte w ocenianej pracy, zostały udokumentowane siedmioma publikacjami współautorstwa Doktorantki, w tym pięcioma w renomowanych czasopismach anglojęzycznych takich jak, *Analytical Methods*, *Journal of Chromatography B*, *Journal of Analytical Methods in*

*Chemistry, Talanta*. Łączny współczynnik oddziaływania (tzw. *Impact Factor*) dla wyżej wymienionych prac wynosi ok. 12,5. Jest to wynik bardzo dobry i ciągle dość rzadki wśród kandydatów do stopnia doktorskiego. Mgr Furmaniak jest także współautorem licznych komunikatów plakatowych i wystąpień ustnych na krajowych i międzynarodowych sympozjach specjalistycznych. Przedstawiona dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności kandydata do stopnia naukowego doktora nauk farmaceutycznych.

Praca doktorska mgr Pauliny Furmaniak jest bardzo wartościowa, zawiera wiele innowacyjnych osiągnięć i cennych oryginalnych wniosków. Maszynopis pracy jest bardzo obszerny i obejmuje ponad 160 stron. Część teoretyczna opisana we wstępie zawiera sporo informacji ogólnych z zakresu metod wzbogacania próbek w kapilarze, ze szczególnym uwzględnieniem metody spiętrzania w różnych wariantach jej stosowania. Opisana została także bardzo szczegółowo charakterystyka wybranych próbek biologicznych (ekstraktów roślinnych, krwi, moczu, śliny) jak również analizowanych związków aktywnych biologicznie. Wspomniany wyżej rozdział pracy, sposobem i szczegółowością opisu, budzi uznanie dla Autorki, która wykazała się doskonałą wiedzą i znajomością przedmiotu opisywanych zagadnień.

Następnie, w części doświadczalnej bardzo dokładnie i szczegółowo opisano takie aspekty pracy eksperymentalnej jak oznaczanie wybranych form witaminy B<sub>6</sub> w preparatach farmaceutycznych, oznaczanie apigeniny w ekstraktach roślinnych, oznaczanie soli sodowej kwasu 2-merkaptioetanosulfonowego w osoczu oraz tiolaktonu homocysteiny w moczu u ludzi. Wymieniony zakres działań eksperymentalnych podjętych w pracy doktorskiej mgr Pauliny Furmaniak jest bardzo obszerny i zasługuje na docenienie. Omówienie wyników i ich dyskusja są napisane szczegółowo i bardzo rzetelnie. Udokumentowane zostały w 12 tabelach i na aż 72 rycinach. Na piśmiennictwo trafnie dobrane i umieszczone w pracy składają się 237 pozycje, z czego zdecydowana większość to publikacje, które ukazały się po 2000 roku.

Doktorantka w toku prowadzonych badań uzyskała wyniki pozwalające na zaproponowanie mniej i bardziej szczegółowych wniosków: 1) połączenie CE z różnymi technikami zateżania analitów w kapilarze, w tzw. trybie on-line, pozwala na opracowanie efektywnych metod, które umożliwiają oznaczanie rozmaitych związków aktywnych biologicznie w różnorodnych matrycach, 2) zastosowanie metod zateżania analitów on-line pozwala na uzyskanie niższych wartości LOD i LOQ w porównaniu z metodami niewykorzystującymi etapu zateżania, a to z kolei umożliwia wykorzystanie podczas analiz taniego w eksploatacji i prostego w obsłudze detektora UV-Vis, 3) stosowanie zateżania w trybie on-line wymaga wstępnego przygotowania próbki, którego głównym celem jest tzw. uproszczenie matrycy, w tym zmniejszenie jej zasolenia, 4) zastosowanie odpowiednio dobranych warunków elektroforetycznych umożliwiło aż 70-krotne obniżenie granicy oznaczalności tiolaktonu homocysteiny w porównaniu z klasyczną elektroforezą strefową, 5) metoda oznaczania chlorowodoru pirydoksyny umożliwiła ok. 20-krotne obniżenie granicy oznaczalności w porównaniu do klasycznej metody elektroforezy kapilarnej przy stosunkowo krótkim czasie analiz (10 min) i bardzo prostym przygotowaniu próbki. Ważne jest też podkreślenie wyjątkowo rzetelnego podejścia badawczego Doktorantki polegającego na przedstawieniu walidacji wszystkich opracowanych czy zmodyfikowanych metody elektromigracyjnych wzbogacania analitów niezależnie od tego jak bardzo aplikacyjne są zaproponowane rozwiązania.

Na osobne uznanie zasługuje wykorzystana w pracy terminologia dotycząca metod wzbogacania próbek i technik elektromigracyjnych, która z racji na stosunkowo wąską grupę osób zajmujących się w Polsce tymi zagadnieniami jest słabo rozwinięta i praktycznie rutynowo nie stosowana.

Praca doktorska mgr Pauliny Furmaniak jest bardzo wartościowa pod względem treści merytorycznych i ma niewątpliwie walory poznawcze. Trudno jest znaleźć słabe strony

recenzowanej dysertacji czy wymienić jej uchybienia. Niejako z obowiązku recenzenckiego, po lekturze dysertacji nasunęły mi się następujące pytania.

Pierwsze pytanie/komentarz związane jest z ilością pracy eksperymentalnej wykonanej przez Doktorantkę w trakcie realizacji doktoratu, która była niezwykle obszerna i musiała być bardzo zajmująca i czasochłonna. Na tym tle uzyskane wyniki wzbogacania analitów mogłyby być uznane, delikatnie mówiąc, za mało satysfakcjonujące. W większości analiz obniżenie granicy oznaczalności wynosiło kilkanaście czy co najwyżej kilkadziesiąt razy. Czy nie ma Doktorantka uczucia frustracji z tym związanego i czym przekonałby potencjalnych zainteresowanych rozpoczęciem badań do wybrania tej samej ścieżki badawczej a nie np. zastosowania wysoce czułych technik spektrometrii mas?

Czy obniżenie granicy oznaczalności to jest to samo co powszechnie w publikacjach w tej tematyce używany „*enhancement factor*”?

Czy oznaczając wartości granicy wykrywalności i oznaczalności (LOD i LOQ) Autorka próbowała zastosować inne podejście niż tylko te oparte na stosunku sygnału do szumu S/N?

Szkoda, że przy opisie optymalizacji metod gdzie omawiana była szerokość pików (jak np. na str. 98) oraz sprawność oznaczeń nie przedstawiano wyników w postaci parametrów takich jak szerokość pików czy liczba półek teoretycznych.

Powyższe komentarze i pytania, nie wpływają na wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr Pauliny Furmaniak ma wyraźne aspekty oryginalności naukowej. Jest połączeniem wiedzy i umiejętności z zakresu elektroforezy kapilarnej z aplikacyjnym nastawieniem na metodykę badań bioanalitycznych. Autorka wykazała się opanowaniem różnorodnych technik i procedur, wymagających specjalistycznego oprzyrządowania.

Biorąc powyższe pod uwagę oraz fakt spełnienia wymagań ustawowych wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Pauliny Furmaniak do publicznej obrony tez przedstawionych w dysertacji. Jednocześnie, mając na uwadze, odzwierciedlający uzyskane wyniki, dorobek publikacyjny Doktorantki, na który składa się w sumie 7 publikacji o łącznej wartości współczynnika oddziaływania IF = 12,5 (w tym trzy prace, w których mgr Furmaniak jest pierwszym Autorem), składam wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Kierownik Katedry  
Biofarmacji i Farmakodynamiki  
  
dr hab. n. farm. Michał Markiszewski  
profesor nadzwyczajny