

Dr hab. Szymon Bocian
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalitiky,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

Toruń, 16 stycznia 2018

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Justyny Piechockiej pt. *"Wysokosprawna chromatografia cieczowa
wybranych pochodnych endogennych tioli"*

Celem pracy doktorskiej Pani mgr Justyny Piechockiej było opracowanie nowych metod analitycznych, opartych o wykorzystanie techniki HPLC-UV-Vis, które umożliwią analizę materiału biologicznego na zawartość aminokwasów tiolowych. Metody te miały uwzględniać zasady zielonej chemii.

Tak postawiony cel badań należy uznać za w pełni zasadny zarówno ze względów poznawczych jak i potencjalnych zastosowań praktycznych. Autorka próbuje również określić relacje pomiędzy stężeniami niskocząsteczkowych tioli w płynach biologicznych (ślina, mocz, osocze) w celu określenia potencjału diagnostycznego śliny, ze względu na fakt, iż ślina wykazuje wiele zalet w stosunku do moczu i osocza krwi, które są najczęściej wykorzystywanych do celów diagnostycznych.

Przesłana mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z wprowadzenia, opisu przeprowadzonych działań, podsumowania, wykazu literatury, życiorysu Autorki i czterech publikacji naukowych, które stanowią zasadniczą część tej rozprawy. Praca rozpoczyna się wykazem stosowanych akronimów i symboli.

We wprowadzeniu Autorka przedstawia zależność pomiędzy chorobami cywilizacyjnymi, takimi jak choroby nowotworowe i choroby układu krążenia, a zaburzonym metabolizmem homocysteiny i powiązanych z nią innych związków siarki. Na tej podstawie Autorka zauważa konieczność rozwoju metod diagnostycznych związków organicznych zawierających siarkę

w płynach biologicznych. Pani mgr Justyna Piechocka wskazuje również jeden z kierunków rozwoju tych metod diagnostycznych, za który uważa nieinwazyjne sposoby pozyskiwania próbek do badań. Jako najmniej inwazyjny Autorka wskazuje ślinę. Ślina jest bowiem pobierana w bezbolesny i nie naruszający prywatności pacjenta sposób. Według cytowanych badań, stosowanie śliny jako materiału diagnostycznego zachęciłoby znaczną grupę osób do regularnego poddawania się badaniom profilaktycznym.

Na kolejnych stronach Pani mgr Justyna Piechocka w dokładny sposób opisuje potencjał zastosowania śliny jako materiału diagnostycznego, podkreślając, iż pomimo prób jej stosowania do diagnostyki markerów różnych chorób, pozostaje niewypełniona nisza na opracowanie metody oznaczania w ślinie homocysteiny i jej pochodnych. Na tej podstawie Autorka postawiła jeden z celów swojej rozprawy doktorskiej. W dalszej części wprowadzenia mgr Justyna Piechocka opisuje możliwości i zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania związków siarki. Tutaj też pojawia się pytanie, czy wymieniony przez Autorkę kwas octowy jest rzeczywiście odczynnikiem tworzącym pary jonowe? W publikacji oznaczonej [67] autorzy wykorzystują kwas octowy w analizie chromatograficznej cysteiny i powiązanych aminotioili, jednak moim zdaniem służy on jedynie zakwaszeniu fazy ruchomej.

W kolejnej części rozprawy mgr Justyna Piechocka opisuje procedurę przygotowania próbek, umożliwiającą wykonanie oznaczenia tioli techniką HPLC z detektorem spektrofotometrycznym. Metoda przygotowania próbki jest bardzo istotna z punktu widzenia całej procedury analitycznej. Dodatkowo, w tym konkretnym przypadku metoda ta musi rozwiązywać serię problemów, począwszy od niskich stężeń analitów w materiale na konieczności derywatywacji kończąc, ponieważ wybrana grupa analitów praktycznie nie wykazuje absorpcji promieniowania w rozsądnym zakresie długości fali. Nie podlega zatem wątpliwości, że przed Autorką pojawił się poważny problem analityczny, który został rozwiązany.

Opracowana przez Autorkę metoda wykorzystuje *tris*(2-karboksyetylo)fosfinę jako odczynnik umożliwiający redukcję mostków disiarczkowych, kwas chlorowy(VII) i wirowanie w celu usunięcia białek na pierwszym etapie przygotowania próbki. Na marginesie wtrączę, że wartościowości atomów podawane w nawiasach pisze się łącznie z nazwą, np. kwasu.

Niezbędnym etapem przygotowania próbki była derywatywacja analitów. Jako odczynnik derywatywujący specyficznie tiole wykorzystano fosforan 5'-pirydoksalu. Jego dodatkową zaletą jest fakt jego niskiego negatywnego wpływu na środowisko. W ramach tego etapu wykonano również badania nad stechiometrią tej reakcji. Zastosowanie fosforanu 5'-pirydoksalu umożliwiło oznaczanie cysteiny i homocysteiny przy długości fali 330 nm. W opisie tej procedury na stronie 18

pojawiają się dwie kwestie. Pierwsze zdanie jest najprawdopodobniej niekompletne (nie składa się gramatycznie) a detektor spektrofotometryczny raczej nie służy do "obserwacji".

Proces derywatywacji analitów za pomocą fosforanu 5'-pirydoksalu był również badany w zmiennym pH, w różnym czasie trwania reakcji, i w różnej temperaturze. Badany był również wpływ nadmiaru stechiometrycznego odczynnika derywatyzującego na wydajność procesu. Podjęte badania świadczą o profesjonalnym podejściu Doktorantki do problemu analitycznego i umożliwiły wybór najkorzystniejszych parametrów przygotowania próbki. Całkowity czas przygotowania próbki według opisaney metody wyniósł około 40 minut, co stawia metodę w czołówce metod podawanych w literaturze. W swoich rozważaniach Doktorantka podchodzi krytycznie do opracowanej procedury, odważnie podając wady swojej metody jak i sposoby na uniknięcie np. niekorzystnego wpływu światła na odczynnik derywatyzujący.

W kolejnej części Pani mgr Justyna Piechocka poszukiwała odczynnika derywatyzującego, który mógłby zostać zastosowany do jednoczesnej derywatywacji szerszej grupy analitów. Wybór Autorki padł na sole oniowe, a wybranym odczynnikiem został tetrafluoroboran 2-chloro-1-metylocholinowy. Parametry procesu derywatywacji zostały przebadane, co umożliwiło wybór najkorzystniejszych. W przeciwieństwie do Autorki nie nazwał bym tych badań "optymalizacją". Był to zdecydowanie dobór parametrów.

Tytuł kolejnej części "*Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego*" budzi wątpliwość z w/w powodu. Niemniej jednak dobór parametrów analizy chromatograficznej został wykonany prawidłowo. Pragnę na tym etapie również zauważyć, że pomimo obowiązującego konkordatu, wyniki badań są miarodajne a nie "wiarygodne".

Na stronie 27, dwa pierwsze zdania budzą pewne wątpliwości: "W przypadku wykorzystywanej w badaniach techniki separacyjnej czynnikiem aktywnym w procesie chromatografowania, który wywierał znaczący wpływ na końcowy efekt rozdzielania składników analizowanych próbek biologicznych, była faza ruchoma. Toteż w pierwszej kolejności dobierano odpowiedni skład jakościowy i ilościowy stosowanych eluentów uwzględniając chociażby ich moc elucyjną, rodzaj zastosowanego wypełnienia kolumny czy detektora." Po pierwsze, dlaczego tym "czynnikiem aktywnym" była tylko faza ruchoma a nie stacjonarna? Co należy rozumieć przez stwierdzenie "czynnik aktywny"? "Uwzględniając "chociażby" moc elucyjną czy może "przede wszystkim".

Wybór parametrów analizy chromatograficznej dokonano na podstawie doboru składu fazy ruchomej (ilość i rodzaj modyfikatora organicznego, pH), prędkości jej przepływu i temperatury. Rezygnacja z doboru pH fazy ruchomej i temperatury w opisanym przypadku jest uzasadniona,

jednakże kontrola tych dwóch parametrów znacząco poprawia powtarzalność metody, szczególnie w dłuższym okresie czasu. Zmiany czasów retencji wywołane zmianami temperatury otoczenia mogą być już widoczne w przypadku kilkunastominutowych analiz.

Pierwszym opisanym układem chromatograficznym zastosowanym do przygotowanych próbek była chromatografia oddziaływań hydrofilowych. Jest to bardzo dobre podejście w przypadku polarnych analitów, takich jak substancje będące przedmiotem niniejszej rozprawy. Zaskakujący jest jednak fakt, że jako zaletę tej techniki Autorka podaje minimalizowanie negatywnego wpływu na środowisko, podczas gdy w tej technice faza ruchoma zawiera głównie acetonitryl. Do części chromatograficznej pojawia się też zasadnicze pytanie, czy pH podawanych faz ruchomych było to rzeczywiste pH hydro-organicznej mieszaniny (a jeśli tak to jak wyznaczone) czy było to pH wodnego roztworu buforowego stosowanego jako jeden ze składników fazy ruchomej? Wątpliwości budzi również profil gradientu przedstawiony pod Rysunkiem 15. Wzrost zawartości acetonitrylu między czasem 2,5 a 3,5 minuty jest zdecydowanie niezgodny z teorią chromatografii.

Bardzo ciekawym aspektem pracy, być może z pobudek osobistych, jest poszukiwanie alternatyw dla substancji chemicznych obciążających środowisko. W tym celu Pani mgr Justyna Piechocka podjęła próbę opracowania warunków rozdzielania chromatograficznego mieszaniny zawierającej Cys i Cys-Gly w możliwie najkrótszym czasie przy jednoczesnym znaczącym ograniczeniu bądź całkowitej eliminacji zużycia toksycznych składników faz ruchomych. Badania te doprowadziły do opracowania metody chromatograficznej, w której jako rozpuszczalnik organiczny zastosowano etanol, który jest uznawany za jeden z najbardziej ekologicznych rozpuszczalników organicznych. Tak więc postawiony przez Doktorantkę cel został w pełni osiągnięty.

W tej części również pojawia się pewna niezgodność. Mianowicie autorka stwierdza, że wzrost przepływu fazy ruchomej do 2 ml/min powoduje, że wszystkie składniki analizowanej mieszaniny były eluowane razem w czasie retencji substancji niezatrzymywanej. O ile mogę zgodzić się, że substancje były eluowane razem (ze względu na krótki czas przebywania w kolumnie) to pragnę zwrócić uwagę, że czas retencji substancji niezatrzymywanej obowiązuje dla danego przepływu, i że jest on odwrotnie proporcjonalny do szybkości przepływu. Zwiększenie przepływu z 1 do 2 ml/min skraca czas retencji substancji niezatrzymywanej o połowę.

Bardzo ciekawym i oryginalnym jest pomysł zastosowania jako składnika fazy ruchomej etanolu spożywczego. Otrzymane wyniki są zaskakująco dobre. Osobiście jednak bał bym się

takiego rozwiązania ze względu na ryzyko obecności cząstek stałych, które mogłyby uszkodzić kolumnę lub aparaturę.

Idąc niejako za ciosem, Pani magister Justyna Piechocka opracowała metodę umożliwiającą oznaczanie grupy tiolowych pochodnych stosując jako składniki fazy ruchomej wodę, etanol i kwas octowy. Od takiego składu fazy ruchomej mniejszy negatywny wpływ na środowisko może mieć tylko faza ruchoma składająca się z samej wody. W tym miejscu pragnę wyrazić uznanie zarówno dla pomysłu Doktorantki jak i dla osiągniętego celu. Drobnym mankamentem w tej części pracy jest stwierdzenie, że mieszanina etanolu i 0,5% kwasu octowego jest dwuskładnikowa.

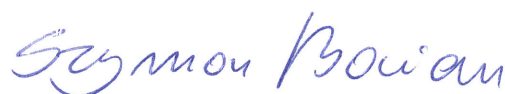
Metody analityczne opracowane przez Panią mgr Justynę Piechocką zostały poddane walidacji a co najważniejsze, zostały one z powodzeniem zastosowane do analizy próbek biologicznych. Otrzymane metody cechuje dobra odtwarzalność a odzysk mieści się w dopuszczalnym zakresie. W opisie walidacji znacznie lepiej posługiwać się polską nomenklaturą używając słowa wzorzec zamiast "standard". Termin "oznaczenie" w nomenklaturze analitycznej dotyczy analizy ilościowej, zatem terminy "oznaczenie występowania" oraz "ilościowe oznaczenie" budzą pewne wątpliwości. O profesjonalnym podejściu do problemu analitycznego świadczą również przeprowadzone badania trwałości przygotowanych próbek. Nie podlega wątpliwości, iż Doktorantka dowiodła, że opracowane metody spełniają najwyższe wymagania stawiane procedurom umożliwiającym oznaczanie istotnych z biologicznego jak i klinicznego punktu widzenia związków w materiale biologicznym. Na podstawie analizy różnych tiolowych pochodnych w moczu, ślinie i osoczu Autorka podjęła próbę korelacji tych wyników w celu wykazania potencjalnego zastosowania śliny jako materiału analitycznego. Otrzymany współczynnik korelacji faktycznie pozwalają na pewien optymizm w tym zagadnieniu. Rysunek 25 wymaga jednak pewnego komentarza, ponieważ jeżeli podaje on współczynnik korelacji (R), to w trzech wypadkach powinien być on ujemny. Współczynnik determinacji natomiast (R^2) byłby zawsze dodatni.

Podsumowując, do największych osiągnięć rozprawy doktorskiej mgr Justyny Piechockiej należy opracowanie trzech nowych, spełniające najwyższe wymagania stawiane tego typu procedurom, metod analitycznych umożliwiających oznaczenie zawartości tiolowych pochodnych w moczu, osoczu i ślinie. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, iż tworząc nowe metody analityczne Doktorantka starała się, aby ich negatywny wpływ na środowisko był możliwie najmniejszy. O dużej świadomości Autorki świadczą również przedstawione na końcu pracy dalsze cele badawcze, możliwości i prognozy rozwoju kierunku prowadzenia badań.

Przed przystąpieniem do oceny wartości naukowej uzyskanych przez mgr Justynę Piechocką wyników trzeba podkreślić, że zostały one już w większości opublikowane w renomowanych czasopismach, takich jak *Analytical and Bioanalytical Chemistry* czy *Talanta*, gdzie również podlegały wnikliwej recenzji przez przynajmniej dwóch recenzentów.

Podsumowując moją ocenę wartości naukowej uzyskanych wyników oraz ich opracowanie w rozprawie doktorskiej stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Justyny Piechockiej spełnia wymogi stawiane przez Ustawy o stopniach i tytule naukowym tego typu opracowaniom. Wnoszę więc do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Justyny Piechockiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ponadto, ze względu na dużą wartość naukową uzyskanych przez Doktorantkę wyników i ponadprzeciętny dorobek naukowy mgr Justyny Piechockiej: 9 opublikowanych prac, których łączny IF=18,255, 49 komunikatów konferencyjnych, liczne staże, udział w projektach badawczych, jak i działalność bezpośrednio niezwiązana z przygotowaniem rozprawy doktorskiej, proponuję wyróżnić rozprawę doktorską i jej Autorkę stosowną nagrodą.



dr hab. Szymon Bocian