



UNIwersytet  
Opolski

WYDZIAŁ CHEMII

ul. Oleska 48, 45-052, Opole  
tel. 077 452 71 00  
fax 077 452 71 01  
chemia@uni.opole.pl  
www.chemia.uni.opole.pl

Prof. dr hab. inż. Piotr P. Wieczorek  
e-mail: [Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl](mailto:Piotr.Wieczorek@uni.opole.pl)

Opole, 2016-11-21

## RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

**Pani mgr Pauliny Błażalek**

z tytułu

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

Oznaczanie śladowych ilości substancji w różnych matrycach z wysoką precyzją i dokładnością stanowi stałe wyzwanie dla chemików analityków. Szczególne zainteresowanie budzi opracowanie efektywnych metod oznaczania związków aktywnych biologicznie, w różnorodnych, skomplikowanych matrycach biologicznych. Obecność tego typu związków w organizmie człowieka, dostarczanych w produktach spożywczych, wywiera bowiem istotny wpływ na jego sprawność psychofizyczną. Dlatego też oznaczanie zawartości tych związków w żywności i suplementach diety dostarcza ważnych informacji na temat ich możliwego zastosowania. Natomiast monitorowanie niektórych metabolitów w płynach fizjologicznych jest ważne z punktu widzenia diagnostyki medycznej. Do oznaczania substancji biologicznie czynnych stosuje się wiele metod. Najczęściej są to metody chromatograficzne, takie jak wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) i chromatografia gazowa (GC) z różnymi detektorami. Niestety pierwsza z nich nie pozwala na analizę mieszanin zawierających zarówno substancje hydrofilowe, jak i hydrofobowe, a metoda GC pozwala na jedynie na analizę związków lotnych. Dlatego też w ostatnich latach coraz to więcej uwagi poświęca się badaniu możliwości wykorzystania technik elektromigracyjnych, w tym elektroforezy kapilarnej (CE) do oznaczania tych związków w różnych matrycach. Elektroforeza kapilarna posiada bowiem wiele zalet, takich jak wysoka selektywność, dobra rozdzielczość, niewielkie zużycie próbki i odczynników, stosowanie wody jako podstawowego rozpuszczalnika, krótkie czasy analizy, możliwość miniaturyzacji i zastosowania różnych

detektorów oraz niski koszt eksploatacji. Ponadto, wykorzystując jedną z technik CE, micelną elektrokinetyczną chromatografię kapilarną (MECC), możliwe jest zastosowanie tej metody dla mieszanin substancji różniących się hydrofilowością i ładunkiem lub jego brakiem. Wadą tej metody jest wysoka wartość granicy wykrywalności wynikająca z niewielkiej objętości próbki oraz krótką drogą optyczną podczas detekcji. Dlatego też poszukuje się sposobów zateżania analitów w układzie pomiarowym pozwalających na obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Pauliny Błażalek dotyczy zatem określenia możliwości wykorzystania technik zateżania wybranych analitów w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej w celu ich oznaczania w próbkach o skomplikowanym składzie.

Rozprawa mgr Pauliny Błażalek napisana została w klasycznym układzie rozdziałów i zawiera wszystkie elementy cechujące bardzo dobrze przygotowaną i napisaną rozprawę doktorską. Przedstawiona do oceny praca składa się z pięciu zasadniczych części, części literaturowej, celu pracy, części doświadczałnej, omówienia i dyskusji wyników oraz podsumowania i wniosków. Ponadto zawiera wykaz skrótów i symboli, krótkie wprowadzenie, streszczenia, bibliografię (237 pozycji literaturowych), wykazy tabel i rysunków i dorobek naukowy Autorki. Część literaturową pracy otwiera omówienie wybranych metod zateżania analitów w kapilarze, ze szczególnym uwzględnieniem metod zateżania z wykorzystaniem mechanizmów kapilarnej elektroforezy strefowej oraz zasad micelarniej chromatografii elektrokinetycznej (MEKC). Następnie Autorka przedstawia charakterystyki wybranych próbek biologicznych (krew, mocz, ślina) oraz analitów będących przedmiotem opracowanych procedur oznaczania. Omawia takie analizy jak formy witaminy B<sub>6</sub>, apigenina, sól sodowa kwasu 2-merkaptoetanosulfonowego i tiolakton homocysteiny. Treści zawarte w tej części rozprawy podane są we właściwych proporcjach i są zgodne z zakresem podjętych badań. Zarówno pod względem merytorycznym, jak i edytorskim ta część pracy świadczy o trafnym doborze treści i nie budzi zastrzeżeń. Część literaturowa poparta jest wieloma aktualnymi i dobrze dobranymi cytacjami z literatury.

W części drugiej mgr Paulina Błażalek sformułowała cel pracy, którym było określenie możliwości wykorzystania technik zateżania wybranych analitów w układzie

pomiarowym, w kontekście ich oznaczania w złożonych matrycach biologicznych. Przedstawiła również cele szczegółowe niezbędne do zrealizowania założonego celu pracy.

W pierwszym rozdziale części doświadczalnej Autorka omawia stosowaną aparaturę, wykorzystywane w badaniach odczynniki i materiały oraz opisuje stosowane procedury analityczne. Następnie charakteryzuje metodyki badawcze do oznaczania wybranych form witaminy B<sub>6</sub> w preparatach farmaceutycznych, apigeniny w ekstraktach roślinnych, soli sodowej kwasu 2-merkaptotanosulfonowego w osoczu i tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka. Omawiając uzyskane wyniki (część „Wyniki i Dyskusja”) Doktorantka w pierwszej kolejności przedstawiła wyniki badań dotyczących optymalizacji warunków oznaczania pirydoksyny (PN) wraz z wynikami walidacji i użycia do próbek preparatów farmaceutycznych. Wykazała, że zastosowanie metody zateżania *on-line*, z wykorzystaniem techniki MEKC pozwala na około 20-krotne obniżenie granicy oznaczalności w porównaniu z klasyczną metodą elektroforezy strefowej (CE) oraz że zaproponowana procedura może być użytecznym narzędziem do oznaczania PN w preparatach farmaceutycznych, konkurencyjnym w stosunku do tradycyjnych metod chromatograficznych i spektrofotometrycznych. Następnie omawia wyniki uzyskane w opracowanej procedurze oznaczania apigeniny (API) oraz użycia tej metody do oznaczania tej substancji w próbkach ziół. Wykazała, że opracowana metoda z użyciem fazy pseudostacjonarnej w postaci miceli SDS pozwala na szybkie, w czasie poniżej 10 minut, oznaczenie API w próbkach wybranych ziół. Po czym omawia wyniki oznaczania soli sodowej kwasu 2-merkaptotanosulfonowego w osoczu. W tym przypadku połączenie techniki CE oraz modyfikacji chemicznej (derywatyzacji), za pomocą tetrafluoroboranu 2-chloro-1-metylolepidyniowego, bezpośrednio w kapilarze pozwoliło na szybkie, dokładne i powtarzalne oznaczenie tej substancji w próbkach osocza na poziomie stężeń do 0,5 µmol/L w ciągu 6 minut. Wreszcie omawia opracowaną po raz pierwszy metodę oznaczania homocysteiny (Hcy) i jej tiolaktonu (HTL) za pomocą CE z wykorzystaniem metody zateżania za pomocą wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola i zmiatania w MEKC. Opracowana metoda została z powodzeniem zastosowana do oznaczania HTL w próbkach moczu człowieka. Ponadto dla wszystkich opracowanych metod przedstawiła mechanizmy zateżania analizowanych związków w kapilarze oraz przeprowadziła ich walidację. Po czym, oprócz podsumowania i wniosków, krótkich streszczeń, spisu literatury i wykazu tabel i rysunków, przedstawia dorobek naukowy i uzyskane nagrody i stypendia. Przedstawiony w dokumentacji dorobek naukowy to 5

publikacji z tzw. Listy Filadelfijskiej i 1 wysłana do redakcji, 3 inne publikacje, w tym 1 w materiałach konferencyjnych, 9 ustnych wystąpień konferencyjnych i 18 plakaty prezentowane na różnej rangi konferencjach naukowych. Brała również udział w kilku projektach badawczych, w tym w jednym finansowanym przez NCN oraz 6 szkoleniach. Recenzent jest pod wrażeniem tak wartościowego dorobku Doktorantki osiągniętego w krótkim przecież czasie studiów doktoranckich. Dorobek ten został doceniony, czego efektem było uzyskanie kilka stypendiów projakościowych i jednej nagrody zespołowej pierwszego stopnia Rektora Uniwersytetu Łódzkiego.

Za najważniejsze dokonania Doktorantki należy uznać:

- opracowanie nowych procedur oznaczania związków biologicznie aktywnych w różnych matrycach z wykorzystaniem metod zateżania *on-line*, pozwalających na zastosowanie taniego i prostego w obsłudze detektora UV-VIS;
- wykazanie, że opracowane procedury analityczne pozwalają na uzyskanie satysfakcjonujących wartości LOD i LOQ;
- wykazanie, że techniki zateżania substancji w układzie pomiarowym mogą być łączone, co upraszcza procedurę oznaczania i pozwala na uzyskanie bardziej powtarzalnych wyników;
- wykazanie, że opracowane procedury stanowią doskonałą alternatywę dla metod chromatograficznych, również w przypadku próbek o skomplikowanych matrycach, takich jak osocze, mocz, czy homogenaty tkanek roślinnych.

Uwagi krytyczne:

1. Wyjaśnienia wymagają dosyć duże wartości SD uzyskane dla wyników analiz PN w niektórych preparatach farmaceutycznych wynoszące od 11 do 18% (Tabela 6)
2. Wobec przedstawionych w Tabeli 8 wartości SD (dla liści rozmarynu, tymianku, szalwii, czy lubczyku), wynoszące w kilku przypadkach od 38% do nawet 57%, mam poważne wątpliwości dotyczące stwierdzenia: „Uzyskane rezultaty wskazują, że opracowana metoda może z powodzeniem być wykorzystywana do oznaczania API w próbkach roślinnych.”. Wymaga to wyjaśnienia.

3. Stwierdzenie, że „...wraz z wydłużającym się czasem eksploatacji kapilary, zmienia się rozmieszczenie ładunków na jej wewnętrznej ścianie, co jest związane z zachodzącą hydrolizą i/lub adsorpcją jonów.” wymaga wyjaśnienia lub udowodnienia. Trudno bowiem doszukać się w pracy bezpośrednich dowodów na takie stwierdzenie.

Pomimo tego, że rozprawa jest napisana bardzo dobrze chciałbym zwrócić uwagę na błędy redakcyjne i literowe, których część przedstawiam poniżej:

str. 4: w spisie treści 3.1.3 powinno być „...aplikacja...”

str. 30, 124 i 146: powinno być „...za pomocą...”,

str. 39, w Tabeli 3: powinno być: „...Kationy...”;

str. 82 i 84: niezręczne sformułowanie: „...odczynnika par jonowych...”

str. 90: powinno być: „...około 20-krotne...”

str. 94: niezręczne sformułowanie: „Badano wpływ długości prowadzonej ekstrakcji...”

str. 148: powinno być „...skądinąd...”

str. 152 powinno być „...umożliwiałyby...” i dalej „elektroforeza kapilarna”

Te usterki redakcyjne i drobne błędy literowe, a jest ich naprawdę niewiele nie utrudniają jednak zrozumienia tekstu i nie wpływają na moją wysoką ocenę recenzowanej rozprawy.

Podsumowując chciałbym stwierdzić, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska reprezentuje wysoki poziom badań i zawiera wiele elementów nowości naukowej. Zakres badań, zawarte w niej wyniki doświadczalne, sposób interpretacji oraz wnioski wskazują, że mgr Paulina Błażalek wykazała umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i wniosła istotny wkład w rozwój badań nad opracowaniem procedur analitycznych do oznaczania związków biologicznie aktywnych, a szczególnie możliwości zastosowania elektroforezy kapilarnej i wykorzystania zateżenia w układzie pomiarowym. Po zapoznaniu się z rozprawą mgr Pauliny Błażalek **stwierdzam, że przedstawiona rozprawa spełnia wszelkie wymagania stawiane w Ustawie o tytule naukowym i stopniach naukowych rozprawom doktorskim i wnoszę o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**



Biorąc pod uwagę fakt, że jest to praca nowatorska, dojrzała, będąca dorobkiem przemysłu i systematycznych badań oraz jej wysoki poziom naukowy, poparty publikacjami w czasopiśmie o cyrkulacji międzynarodowej, wnioskuję o wyróżnienie pracy doktorskiej mgr Pauliny Błażalek. Autorka wykazała bowiem, że metoda oznaczania związków biologicznie czynnych za pomocą elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem zateżenia w układzie pomiarowym stanowi doskonałą alternatywę dla metod chromatograficznych, również w przypadku próbek o skomplikowanych matrycach, takich jak osocze, mocz, czy homogenaty tkanek roślinnych.

*P. Winiogrod*