

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgra Michała Sergiusza Pieckowskiego
pt. *Analiza wybranych związków hydrofobowych przy użyciu technik elektromigracyjnych*

Wstęp

Metody rozdzielania są szeroko stosowane w wielu gałęziach współczesnej chemii, a techniki chromatograficzne i elektromigracyjne należą do najczęściej stosowanych. Popularność układów chromatograficznych wynika nie tylko z ich skuteczności czy względnie dużej uniwersalności, ale także możliwości zastosowania ich w różnej skali wielkości – od systemów mikroanalitycznych (np. *lab-on-a-chip*), aż do preparatywnych w skali laboratoryjnej czy przemysłowej. Chromatografia w skali preparatywnej to podstawa wyodrębniania i oczyszczania pojedynczego lub kilku związków z mieszanin otrzymywanych w wyniku syntezy zwłaszcza nowych substancji (np. farmaceutyków).

Z kolei techniki elektromigracyjne, takie jak elektroforeza kapilarna w różnych swoich odmianach znalazła swoje praktyczne zastosowanie tam, gdzie objętości roztworu, w którym przebiega proces rozdzielania są bardzo niewielkie, ze względu na wydzielane ciepło Joule'a. Poważną wadą handlowo dostępnych aparatów do elektroforezy kapilarnej jest niska czułość w porównaniu z chromatografią cieczową gdy stosuje się detekcję spektrofotometryczną. Związane jest to z niewielką długością drogi optycznej, zazwyczaj równą wewnętrznej średnicy kapilary. O ile w kapilarnej chromatografii cieczowej można polepszyć czułość poprzez zwiększenie objętości dozowanej próbki stosując rozwiązania oparte na zminiaturyzowanej ekstrakcji do fazy stałej połączonej *on-line* z kolumną separacyjną poprzez mniej lub bardziej skomplikowany układ zaworów, to w kapilarnych technikach elektromigracyjnych nie jest to możliwe. W takich przypadkach stosować można metody wzbogacania próbki w kapilarze wykorzystując zjawiska elektromigracyjne. Opracowywanie nowych metodyk takiego wzbogacania jest jednym z najważniejszych trendów rozwoju współczesnej elektroforezy kapilarnej oraz technik pochodnych. Zagadnieniom tym poświęcona jest rozprawa doktorska Pana mgr. farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego wykonana w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod kierunkiem dr. hab. Piotra Kowalskiego, prof. GUMed.

Ocena merytoryczna rozprawy

Przedłożona mi do oceny rozprawa liczy 68 stron i bazuje na czterech spójnych tematycznie publikacjach naukowych, opublikowanych w latach 2019-2022. Pierwsze 36 stron rozprawy zajmują opis badań przeprowadzonych podczas jej realizacji wraz z celem i wnioskami a także streszczenia (w języku polskim i angielskim). Sam opis zrealizowanych badań poprzedzony jest wprowadzeniem opisującym metodyki elektromigracyjnego rozdzielania i wzbogacania próbek stosowanych w

przypadku analitów hydrofobowych. Autor jednoznacznie wskazuje, że o ile nowatorskie sposoby rozdzielania takich związków za pomocą elektroforezy i różnych odmian chromatografii elektrokinetycznej są opisywane w literaturze, to w zakresie ich wzbogacania *on-line* w kapilarze jest jeszcze wiele do zrobienia. Uważam, że rozważania Autora przeprowadzone w tej części pracy w pełni uzasadniają celowość badań. Stwierdzam również, że ta część pracy, dotycząca sposobów zwiększania stężenia analitów, przedstawiająca ich zalety i wady została przygotowana przez Pana mgra Michała Pieckowskiego z ogromną starannością, z widoczną dbałością o precyzję wypowiedzi i bez tendencji do rozwlekłości. Niestety zauważalne są (co prawda nieliczne) błędy językowe, edytorskie i interpunkcyjne, wynikające zapewne z pośpiechu. Przygotowując tę część rozprawy Autor skorzystał z 95 pozycji literaturowych, co jednoznacznie pozwala umiejscowić Jego działalność wśród najbardziej aktualnych trendów badawczych.

Po części wstępnej Doktorant zamieścił kopie czterech artykułów naukowych będących podstawą rozprawy. Zostały one opublikowane w latach 2019-2022 w renomowanych czasopismach znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports*, a ich współczynniki oddziaływania (*Impact Factor*) zawierają się w granicach od 3,535 do 6,057. W trzech publikacjach Pan mgr Michał Pieckowski jest pierwszym autorem, w żadnej z nich nie jest autorem korespondencyjnym. Załączone oświadczenia współautorów określające ich udział w powstaniu artykułów pozwalają jednoznacznie stwierdzić, że Kandydat pełnił kluczową rolę w planowaniu, wykonywaniu eksperymentów i interpretacji uzyskanych wyników, a także w przygotowaniu wstępnych wersji manuskryptów publikacji.

Celem nadrzędnym prowadzonych przez Doktoranta badań było opracowanie nowych strategii w analizie związków hydrofobowych poprzez opracowanie składów rozpuszczalników próbki oraz buforów separacyjnych tak, aby możliwe było wzbogacanie *on-line* wybranych analitów modelowych.

Cele szczegółowe są cztery i dotyczą zagadnień opisanych w publikacjach będących osiągnięciem naukowym Doktoranta. W pierwszym podejściu, opisanym w publikacji D1 Pan mgr Michał Pieckowski opracował i przebadął skład rozpuszczalnika próbki umożliwiający zażyczenie antybiotyków makrolidowych (charakteryzującymi się wartościami logP powyżej 4) poprzez dozowanie elektrokinetyczne ze wzmocnieniem pola elektrycznego (FASI). Aby było to możliwe, wykorzystał mechanizm znany z elektrokinetycznej chromatografii oddziaływań hydrofobowych (HIEKC), czyli poprzez dodanie środka powierzchniowo czynnego do rozpuszczalnika próbki nadał analitom ładunek ujemny dzięki hydrofobowym oddziaływaniom między badanymi cząsteczkami a łańcuchami węglowodorowymi SDS. W tym prostym, a przez to bardzo eleganckim rozwiązaniu, osiągnięto w zasadzie trzy cele: dodatek SDS pozwolił na zwiększenie rozpuszczalności, zmniejszenie ilości dodawanego do próbki acetonitrylu oraz nadał analitom ładunek co umożliwiło ich dozowanie FASI i następujące po nim rozdzielanie elektroforetyczne. Kandydat wykazał, że dodatek SDS powinien być niewielki, poniżej krytycznego stężenia micelarnego. Według Autora, osiągnięte współczynniki

wzmocnienia sygnału wynoszą od 17 do 63, a opracowana metodyka mogła być zastosowana do oznaczenia zawartości spiromycyny w tabletkach.

W drugiej publikacji Doktorant porównał efektywność rozdzielania ośmiu substancji konserwujących (parabeny oraz kwasy sorbowy, benzoesowy i p-hydroksybenzowsowy) stosując chromatografię elektrokinetyczną w buforze zawierającym cyklodekstryny, gdzie Autor porównał α -cyklodekstrynę oraz sulfonowane α - i β -cyklodekstryny. W wyniku przeprowadzonych badań wykazał, że dodatek niemodyfikowanej cyklodekstryny skutkuje polepszeniem rozdzielczości analitów (w porównaniu z sulfonowanymi) i w połączeniu ze spiętrzaniem dużej objętości próbki w odwróconej polaryzacji elektrod (LVSS-PS) umożliwia uzyskanie dużo niższych niż opisane w literaturze granic wykrywalności. Doktorant wykazał również, że korzystne jest aby pH rozpuszczalnika próbki było raczej obojętne, podczas gdy pH buforu separacyjnego – zasadowe.

Bardzo interesujące podejście analityczne zaprezentował Doktorant oznaczając w moczu lek przeciwnowotworowy mitotan i jego główny metabolit oraz pięć hormonów steroidowych. Jako metodę przygotowania próbki (5 ml moczu) zastosował mikroekstrakcję dyspersyjną ciecz-ciecz, a następnie, w celu dalszego wzbogacenia wyizolowanych analitów – metodę zmiatania z odwróconą polaryzacją elektrod poprzedzającą rozdzielanie MEKC. Niewątpliwym sukcesem Pana Michała Pieckowskiego było dobranie efektywnego solubilizatora próbki, jakim był kompleks $\text{SDS}_1@ \beta\text{-CD}_2$, co umożliwiło zredukowanie ilości acetonitrylu (zaburzającego przepływ prądu podczas rozdzielania) i obniżenie stężenia wolnego SDS, a także wykazanie, że w dodatek $\beta\text{-CD}$ do micelnego układu separacyjnego polepsza rozdzielczość przy niewielkim wydłużeniu czasu analizy. Opracowana metodyka została poddana walidacji, a uzyskane granice wykrywalności i oznaczalności są znacząco niższe niż podawane w literaturze. Przy lekturze rozprawy oraz publikacji D3 zabrakło mi krótkiej dyskusji dotyczącej tego, dlaczego właściwie kompleks $\text{SDS}_1@ \beta\text{-CD}_2$ tak znacząco polepszył rozpuszczalność badanych analitów charakteryzujących się wysoką hydrofobowością. Jestem ciekaw opinii Doktoranta na ten temat.

Czwarta z przedstawionych publikacji dotyczy zastosowania nano- i mikroemulsji podczas wzbogacania i podczas elektrochromatograficznego rozdzielania. Biorąc pod uwagę przedmiot badań, czyli anality hydrofobowe, wybór układów emulsyjnych jest w pełni uzasadniony. O ile technika mikroemulsyjnej chromatografii elektrokinetycznej, MEEKC, jest znana (co nie oznacza, że szeroko wykorzystywana) to opracowanie przez Doktoranta metodyki wzbogacania *on-line* z wykorzystaniem nanoemulsji jest niewątpliwym sukcesem i stanowi nowość naukową. Pan mgr Michał Pieckowski zastosował tu dwie techniki: dozowanie elektrokinetyczne we wzmocnionym polu elektrycznym (FASI) oraz dozowanie elektrokinetyczne wspomaganie ciśnieniem (PAEKI). Badane anality modelowe obejmowały witaminy rozpuszczalne w tłuszczach, iwermektynę i DDT, a opracowaną metodykę Doktorant z sukcesem zastosował do oznaczania witaminy K_2 w suplemencie diety.

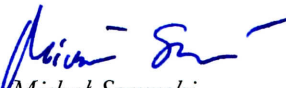
Osiągnięte i opisane przez Autora rezultaty uważam za bardzo wartościowe i dla mnie osobiście niezwykle interesujące. Stosowanie w praktyce technik wzbogacania próbek w kapilarze przed rozdzielaniem elektroforetycznym wymaga nie tylko dogłębnego zrozumienia zachodzących zjawisk elektrokinetycznych, ale także doskonałego opanowania „warsztatu” aparaturowego. Pan mgr Michał Pieckowski wykazał, że jest doświadczonym badaczem o niewątpliwym potencjale naukowym.

Ogólna ocena rozprawy i wniosek końcowy

Podstawą ocenianej rozprawy są cztery publikacje, które ukazały się w renomowanych czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej. Poddane zostały one ocenie recenzentów, więc ewentualna krytyka z mojej strony na tym etapie nie powinna już mieć miejsca. Jak już wspomniałem wyżej, część wstępna rozprawy zawiera nieliczne błędy językowe czy interpunkcyjne, jednak nie wpływają one na ogólną wysoką ocenę recenzowanej pracy.

Podsumowując, w mojej opinii zaprezentowane w ramach ocenianej rozprawy doktorskiej publikacje stanowią dobrze przemyślane i bardzo dobrze zrealizowany spójny cykl badawczy. Osiągnięcia Doktoranta umiejscowione mogą być zarówno w sferze teoretycznej oraz analitycznej i moim zdaniem mogą mieć duże znaczenie praktyczne. Całość przygotowana jest w sposób kompletny, a załączone dokumenty nie pozostawiają wątpliwości co do merytorycznego wkładu Doktoranta. Sumaryczny współczynnik oddziaływania (*Impact Factor*) publikacji składających się na ocenianą rozprawę wynosi 20,170, cytowane były one 30 razy, a współczynnik $h = 3$. Jest to bardzo dobry wynik biorąc pod uwagę maksymalnie czteroletnią obecność tych artykułów w obiegu światowym i świadczy to o dużym zainteresowaniu tematyką badawczą Doktoranta. Wyniki swojej pracy Kandydat prezentował na siedmiu konferencjach krajowych (brak niestety informacji, które z wystąpień to wykłady, a które to prezentacje w formie plakatu). Uważam, że osiągnięcie naukowe Pana mgr. Michała Sergiusza Pieckowskiego stanowi istotny wkład w rozwój chemii analitycznej oraz analityki farmaceutycznej i biomedycznej, a w szczególności w rozwój technik rozdzielania.

Stwierdzam więc, że oceniana rozprawa doktorska spełnia wymogi art. 187 ust. 1-3 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*) i wnoszę do Rady Nauk Farmaceutycznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pana mgr. farm. Michała Sergiusza Pieckowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową ocenianej pracy oraz dorobek Doktoranta, stawiam wniosek o jej wyróżnienie.


Michał Szumski

Toruń, 22 czerwca 2023 r.