
Bydgoszcz, 10.08.2023 r.

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Pani mgr Natalii Kaczmarczyk pod tytułem

„Zastosowanie cieczy jonowych do ekstrakcji i rozdzielania metodą MEKC amin biogennych”

Praca wykonana na Wydziale Farmaceutycznym

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

pod kierunkiem promotora dr hab. n. farm. Jana Ilony Olędzkiej

Ciecze jonowe jako „przyjazne” dla środowiska rozpuszczalniki stanowiące bezpieczniejszą alternatywę dla „klasycznych” rozpuszczalników ze względu na swoje unikalne właściwości fizykochemiczne, a w tym rozpuszczalność, termiczną stabilność i małą lotność znajdują coraz szersze zastosowanie w wielu technikach rozdzielania jako m.in. modyfikatory fazy stacjonarnej czy buforów separacyjnych. Zastosowanie cieczy jonowych w metodach elektroforezy kapilarnej wiąże się z ich dobrą przewodnością elektryczną i wpływem na migrację analitów związaną również z tworzeniem przez te związki warstwy powlekającej ściany kapilary, co powoduje redukcję interakcji pomiędzy analizowanymi substancjami a ścianą kapilary, co zwiększa zakres pH buforu separacyjnego wpływając zazwyczaj korzystnie na zwiększenie zarówno czułości jak i powtarzalności oznaczeń. Ciecze jonowe znajdują również coraz szersze zastosowanie nie tylko w optymalizacji metod rozdzielania i oznaczeń analitów, ale także na etapie izolacji analitów z matrycy analizowanej próbki z wykorzystaniem technik ekstrakcyjnych, zwiększając selektywność czy wydajność ekstrakcji oznaczanych związków. Stąd podjęta przez Panią mgr Natalię Kaczmarczyk tematyka badawcza, koncentrująca się na poszukiwaniu nowych rozwiązań analitycznych dotyczących wykorzystania cieczy jonowych zarówno na etapie izolacji analitów z matrycy próbki, jak i na etapie rozdzielania i oznaczeń z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych celem oznaczania amin biogennych w próbkach biologicznych, jest bezsprzecznie ważna w aspekcie istotnego klinicznie znaczenia amin biogennych i ich metabolitów jako potencjalnych biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych wielu chorób nowotworowych, czy neurodegradacyjnych, a jednocześnie tematyka ta znakomicie wpisuje się w zagadnienia dotyczące współczesnej wieloaspektowej analityki farmaceutycznej.



Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska, stanowi spójny tematycznie zbiór pięciu prac eksperymentalnych opublikowanych w latach 2018-2023 w recenzowanych czasopismach naukowych z listy filadelfijskiej o sumarycznym wskaźniku Impact Factor równym **22,784** i **360** punktach ministerialnych. W trzech publikacjach wchodzących w skład cyklu Doktorantka jest pierwszym autorem. Ponadto, wyniki badań uzyskanych przez Doktorantkę były również prezentowane na piętnastu krajowych i zagranicznych konferencjach naukowych. Osiągnięcia te wskazują zatem, na istotne znaczenie naukowo-badawcze tematyki realizowanego doktoratu.

Odnosząc się bezpośrednio do układu przedłożonej do oceny pracy doktorskiej, to podobnie jak w klasycznych dysertacjach, zawiera spis treści, wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej wraz z wykazem doniesień zjazdowych, wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, które w wprowadza czytelnika w zagadnienia poruszane w pracy, wstęp, cel pracy, materiały i metody. W dalszej części, praca zawiera część główną rozprawy nazwaną omówienie wyników w oparciu o publikacje składające się na rozprawę, a po niej rozdział podsumowanie cyklu publikacji, w których opisane zostały wyniki uzyskane w trakcie realizacji prac badawczych wraz z dyskusją wyników oraz wnioskami. Rozprawę kończy spis literatury, a także kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej. Aczkolwiek, w przedłożonej do oceny pracy doktorskiej, zabrakło stosownego wykazu oświadczeń wszystkich współautorów opublikowanych prac naukowych, co zostało uzupełnione później w formie nadesłanego suplementu. Dobrą praktyką jest również zamieszczenie w rozprawie doktorskiej rozdziału, w którym Kandydatka do stopnia doktora przedstawiłaby swoje CV naukowe oraz informacje dotyczące dotychczasowej całkowitej aktywności naukowo-badawczej, a niezwiązanej jedynie z tematyką realizowanego doktoratu. W związku z tym prosiłbym Doktorantkę, o przedstawienie takich informacji podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Niemniej jednak, pomimo powyższych uwag, stwierdzić należy, że układ pracy doktorskiej jest przejrzysty i nie budzi zastrzeżeń, a dodatkowo praca napisana jest z dużą dbałością o stronę merytoryczną rozprawy, ale również o poprawny język i formę. Przedstawiona w pracy dyskusja uzyskanych wyników w porównaniu do obecnego stanu wiedzy w tym zakresie, potwierdza nie tylko dużą wiedzę, ale i wskazuje na duże zaangażowanie Doktorantki w tematykę naukowo-badawczą realizowanej pracy doktorskiej.

Istotnym podkreślenia jest, że wyniki badań uzyskane w ramach ocenianej dysertacji zostały już opublikowane w bardzo znanych i cenionych czasopismach o zasięgu międzynarodowym (dwie prace



opublikowane w *Talanta* oraz po jednej pracy opublikowanej w *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Separations* czy w *Journal of Chromatography A*), dlatego jestem przekonany, że ich poprawność merytoryczna wraz z interpretacją uzyskanych wyników, została już zweryfikowana przez niezależnych recenzentów w procesie *peer review*, dlatego też, jako recenzent z obowiązku dokonam jedynie krótkiej analizy zawartości publikacji wchodzących w skład cyklu pod kątem ich spójności tematycznej oraz nowości naukowej.

Po zapoznaniu się z treścią publikacji jednoznacznie stwierdzam, że publikacje te zostały dobrze zaplanowane, a zarówno zakres zrealizowanych badań, ich dyskusja oraz wnioski w nich przedstawione są na wysokim poziomie pod względem merytorycznym, jak i edytorsko-graficznym.

Cel badań prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej został jasno sprecyzowany i dotyczył dwóch głównych aspektów, naukowego i praktycznego (aplikacyjnego), w którym jeden, dotyczył opracowania z użyciem cieczy jonowych warunków ekstrakcyjnych izolacji amin biogennych z próbek moczu wraz z zastosowaniem praktycznym opracowanej optymalnej metody ekstrakcyjnej do analizy rzeczywistych próbek klinicznych, a drugi aspekt, który obejmował określenie wpływu cieczy jonowych jako składnika buforu separacyjnego na możliwość rozdzielania i oznaczeń amin biogennych w próbkach biologicznych z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych oraz zastosowanie praktyczne wybranych w tych badaniach cieczy jonowych do analizy amin biogennych w próbkach moczu uzyskanych od pacjentów onkologicznych.

Doprecyzowując, aby zrealizować założone cele Doktorantka zaplanowała i wykonała szereg prac, gdzie w ramach etapu naukowego opracowała skuteczną metodę mikroekstrakcji techniką SPME opartą na wzbogacaniu fazy desorbującej anality (wybrane aminy biogenne i ich metabolity) o wybrane do badań cieczy jonowe oraz wykonała analizę analitów z wykorzystaniem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej (MEKC) (publikacja 1), a następnie w ramach etapu praktycznego zvalidowała tak opracowane postępowanie analityczne i wykorzystwała z powodzeniem do oznaczania ilościowego amin biogennych w próbkach moczu pochodzących zarówno od pacjentów z różnymi typami nowotworów, jak i zdrowych ochotników (publikacja 2). Ponadto, w dalszych badaniach naukowych, Doktorantka, przetestowała, celem określenia wydajności ekstrakcji wybranych amin biogennych, 25 różnych rozwiązań ekstrakcyjnych opartych o techniki DLLME, SPE oraz SPME, biorąc zarówno pod uwagę różne złoża absorbujące, jak również różne układy ekstrahentów i desorbentów modyfikowanych przez różne cieczy jonowe (publikacja 3). W następnym etapie badań naukowych, Doktorantka skoncentrowała się na aspekcie dotyczącym określenia wpływu



cieczy jonowych jako składnika buforu separacyjnego na możliwość rozdzielania i oznaczeń amin biogennych z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych, gdzie dokonała oceny wpływu 13 cieczy jonowych o różnej budowie chemicznej (w szczególności zbudowanych z kationów zawierających pierścieni imidazolu z różnymi podstawnikami alkilowymi i różnymi anionami) na skuteczność separacji związaną z pokryciem ściany kapilary warstwą kationową i zapobieganiu przez to sorpcji analitów na kwarcowych ściankach kapilary, co skutkowało zwiększeniem stabilności procesu rozdzielania i poprawę powtarzalności czasów migracji oznaczanych analitów (publikacja 4). Natomiast w ramach etapu badań aplikacyjnych, Doktorantka, dla dwóch wyselekcjonowanych wcześniej (publikacja 4) imidazolowych cieczy jonowych z różnymi anionami (chlorku oraz tetrafluoroboranu 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego) określiła ich wpływ jako składnika buforu separacyjnego na skuteczność separacji i możliwość oznaczeń amin biogennych z wykorzystaniem metody MEKC w moczu pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem (publikacja 5).

Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzonych badań, Doktorantka sformułowała poprawnie wnioski podsumowujące najważniejsze osiągnięcia odpowiadające założonemu celowi pracy. Pani mgr Natalia Kaczmarczyk w swoich badaniach wykazała m.in., że dodatek tetrafluoroboranu 1-etylo-3-metyloimidazoliowego do roztworu desorbującego podczas ekstrakcji z użyciem SPME pozwala na skuteczną i wydajną izolację amin biogennych obecnych w śladowych ilościach w próbkach moczu (publikacja 1). Takie podejście pozwoliło również na obniżenie granicy wykrywalności i wykorzystanie aplikacyjne opracowanego postępowania analitycznego opartego o SPME-IL-MEKC do oznaczania ilościowego amin biogennych w próbkach moczu pochodzących zarówno od pacjentów z różnymi typami nowotworów, jak i zdrowych ochotników, gdzie opracowana i zwalidowana metoda spełnia zarówno wymagania FDA, jak i kryteria ICH dotyczące metod analitycznych (publikacja 2). Jednocześnie uzyskane rezultaty pokazały również, że etap przygotowania próbki biologicznej zawierającej aminy biogenne z wykorzystaniem techniki SPE lub SPME i użyciem do ekstrakcji i desorpcji metanolu modyfikowanego cieczą jonową (bis(trifluorometylosulfonylo)imidem 1-etylo-3-metyloimidazoliowym) może być wykorzystywany jako skuteczna technika prekoncentracji offline amin biogennych z materiału biologicznego (publikacja 3). Dodatkowo, przeprowadzone przez Doktorantkę badania wykazały, że dzięki zastosowaniu kationowych cieczy jonowych, dynamiczne powlekanie warstwą kationową powierzchni ścianek kapilary podczas analizy MEKC korzystnie wpływa na powtarzalność czasów migracji oznaczanych amin biogennych (publikacja 4). Przeprowadzone badania wykazały również na



skuteczną możliwość oznaczeń amin biogennych w rzeczywistych próbkach pacjentów ze zdiagnozowanym nowotworem z wykorzystaniem metody MEKC i zastosowaniem jako istotnego składnika buforu separacyjnego chlorku 1-heksylo-3-metyloimidazoliowego (publikacja 5). Tym samym uzyskane przez Panią mgr Natalię Kaczmarczyk wyniki wskazują na zasadność podjętej tematyki badawczej oraz jej nowatorski charakter i aplikacyjność, wskazując na możliwość skutecznego wykorzystania cieczy jonowych w ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej czy modyfikatora procesów rozdzielania analitów z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych.

Podsumowując, z przyjemnością stwierdzam, że odnosząc się do całej rozprawy doktorskiej Pani mgr Natalii Kaczmarczyk zatytułowanej „*Zastosowanie cieczy jonowych do ekstrakcji i rozdzielania metodą MEKC amin biogennych*”, to trudno w tej pracy znaleźć słabe strony i jako recenzent nie mam żadnych wątpliwości, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska jest pracą nowatorską, wartościową i stanowi oryginalny i twórczy wkład w rozwój współczesnej wieloaspektowej analityki farmaceutycznej dotyczącej poszukiwania nowych rozwiązań analitycznych dotyczących wykorzystania cieczy jonowych zarówno na etapie izolacji analitów z matrycy próbki, jak i na etapie rozdzielania i oznaczeń z wykorzystaniem technik elektromigracyjnych celem oznaczania amin biogennych w próbkach biologicznych, jako potencjalnych biomarkerów biologicznych.

Wnioski końcowe

W związku z powyższym przedstawiona dysertacja spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i z pełnym przekonaniem wnioskuję i proszę Wysoką Radę Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Gdańsku o dopuszczenie Pani mgr Natalii Kaczmarczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu, w dyscyplinie nauki farmaceutyczne.

Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Uzasadnienie

Oceniana praca wnosi istotny twórczy wkład w rozwój nauk farmaceutycznych w obszarze analityki farmaceutycznej związanych z wykorzystaniem cieczy jonowych do optymalizacji metod



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Farmaceutyczny
Collegium Medicum w Bydgoszczy

Dr hab. inż. Marcin Koba, prof. UMK
KATEDRA TOKSYKOLOGII I BROMATOLOGII
ul. Dr. Jurasza 2, 85-089 Bydgoszcz,
tel. +48 52 585 39 42, fax +48 52 585 35 29
e-mail: kobamar@cm.umk.pl

analizy farmaceutycznej związków w materiale biologicznym. Uzyskane wyniki badań zostały opublikowane w formie pięciu prac oryginalnych w recenzowanych czasopismach naukowych, a w trzech z nich Doktorantka jest pierwszym autorem. Sumaryczny IF publikacji będących podstawą dysertacji wynosi 22,784 a punktacja ministerialna 360 pkt., co należy bez wątpienia uznać za istotnie znaczące osiągnięcie na tak wczesnym etapie kariery naukowej.

Kierownik
Katedry Toksykologii i Bromatologii


dr hab. inż. Marcin Koba, prof. UMK