

dr hab. Renata Wawrzyniak
Zakład Biofarmacji i Farmakokinetiki
Katedra Biofarmacji i Farmakodynamiki
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, 23 października 2024 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Krzemińskiej

pt. *Badanie selektywności nowej generacji chemicznie związanych faz stacjonarnych z wbudowaną grupą polarną do chromatografii cieczowej,*

wykonanej pod kierunkiem dr hab. Szymona Bociana, prof. UMK
w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalityki
Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu

Wysokosprawna chromatografia cieczowa, a także ultrawysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z odpowiednimi metodami detekcji, niewątpliwie należą do jednych z najdynamiczniej rozwijających się technik łączonych, które znajdują szerokie zastosowanie w analizach biomedycznych, farmaceutycznych czy środowiskowych. Pomimo wielu dostępnych usprawnień technologicznych, analiza chromatograficzna związków o charakterze polarnym, zwłaszcza w odwróconym układzie faz, wciąż stanowi spore wyzwanie analityczne. Zastosowanie oktadecylowej fazy stacjonarnej (C18) do analizy związków polarnych wiąże się z koniecznością zmodyfikowania fazy ruchomej. Niestety, dodatek soli buforujących, kwasów, odczynników tworzących pary jonowe czy jonowych środków powierzchniowo czynnych, może niejednokrotnie zmniejszać powtarzalność uzyskanych wyników oraz znacznie skrócić czas życia kolumn chromatograficznych. W związku z tym, wprowadzenie alternatywnych wypełnień kolumn chromatograficznych wydaje się w pełni uzasadnione. Przykładem takiego rozwiązania są m.in. fazy stacjonarne z wbudowaną grupą polarną. Dodatkowo, dbałość o środowisko naturalne i jego zrównoważony rozwój, jako jedno z głównych założeń „zielonej chemii”, stanowią dodatkowe powody do syntezy nowych faz stacjonarnych, szczególnie

takich, które umożliwią prowadzenie oznaczeń chromatograficznych z zastosowaniem czystej wody jako fazy ruchomej. W te aktualne oraz istotne w nowoczesnej chemii analitycznej kierunki badawcze wpisuje się rozprawa doktorska mgr Katarzyny Krzezińskiej.

Oceniana rozprawa doktorska stanowi cykl sześciu powiązanych tematycznie publikacji naukowych, z czego dwie to prace przeglądowe (D1 i D2) przygotowane w języku polskim, a cztery pozostałe to anglojęzyczne prace eksperymentalne (D3-D6). Zostały one opublikowane w renomowanych i wysoko klasyfikowanych (Q1, Q2) w dziedzinie nauk chemicznych czasopiśmie naukowych tj.: *Green Chemistry Letters and Reviews*, *Journal of Chromatography A* oraz *Analyst*. Sumaryczna wartość współczynnika oddziaływania tych prac to 16,8 punktów oraz 410 punktów MEiN, a liczba cytowań wynosi 38. W trzech pracach Doktorantka jest pierwszym, a w trzech pozostałych drugim współautorem. Główne elementy recenzowanej rozprawy doktorskiej, liczącej 124 strony, to: wstęp teoretyczny, cel badań, część doświadczalna, podsumowanie wyników oraz wnioski. Na końcu rozprawy Doktorantka umieściła streszczenia w języku polskim oraz angielskim, zestawienie dorobku naukowego oraz oświadczenia współautorów publikacji, będących podstawą recenzowanej dysertacji.

W części teoretycznej ocenianej pracy, zawartej w rozdziale zatytułowanym *Problem badawczy*, Doktorantka szczegółowo przedstawiła zagadnienia dotyczące faz stacjonarnych z wbudowaną grupą polarną, zwłaszcza pod kątem oznaczeń analitycznych związków o charakterze polarnym. Autorka szczegółowo opisała etapy syntezy faz stacjonarnych z wbudowaną grupą estrową oraz fosfoestrową, a także scharakteryzowała właściwości tych materiałów w oparciu o analizę elementarną, badania spektroskopowe oraz ocenę potencjału zeta. Z kolei ocena właściwości powierzchniowych zsyntetyzowanych faz stacjonarnych obejmowała takie parametry, jak: hydrofobowość, polarność oraz ocenę procesów solwatacyjnych poprzez wyznaczenie izoterm nadmiarowych adsorpcji rozpuszczalników. Selektowność faz stacjonarnych z wbudowaną grupą polarną oceniono w oparciu o charakterystykę oddziaływań międzycząsteczkowych.

Cel pracy oraz zadania badawcze zostały prawidłowo sformułowane. Część eksperymentalną stanowią załączone publikacje naukowe. Jak wspomniano wcześniej,

publikacje D1 i D2, jako prace przeglądowe, dotyczą syntezy oraz właściwości fizykochemicznych faz stacjonarnych do chromatografii cieczowej z wbudowaną grupą polarną. Według Autorów, założenia „zielonej chemii” w kontekście chromatografii cieczowej, mogą być osiągnięte przede wszystkim poprzez częściowe lub całkowite wyeliminowanie rozpuszczalników organicznych w analizach chromatograficznych. Prace eksperymentalne (D3-D6) opisują wyniki badań dotyczących nowo zsyntetyzowanych faz stacjonarnych z wbudowaną grupą estrową (Diol-Ester C18, Diol-Ester C10, Diol-Ester Fenyl, Diol-Ester-Chol) lub fosfoestrową (Amino-P-C18, Diol-P-C10, Diol-P-C18) na nośniku diolowym. W załączonych publikacjach naukowych opisano syntezę wyżej wymienionych faz stacjonarnych, charakterystykę ich właściwości powierzchniowych, ocenę selektywności oraz ich zastosowanie w oznaczeniach związków o aktywności biologicznej (tj.: alkaloidów purynowych, nukleozydów, zasad azotowych), w przypadku użycia wody jako jedynego składnika fazy ruchomej. Wnioski z uzyskanych wyników zostały poprawnie sformułowane i są w pełni zgodne z założeniami oraz celem badań. Uważam, że oceniana rozprawa doktorska stanowi istotny wkład w poszerzenie wiedzy na temat chemizmu powierzchni, oddziaływań międzycząsteczkowych i selektywności chemicznie związanych faz stacjonarnych z wbudowaną grupą polarną. Doktorantka osiągnęła to przede wszystkim na podstawie wyznaczonych wartości potencjału zeta, parametrów LSER oraz oceny oddziaływań wtórnych pomiędzy składnikami mieszanin testowych a powierzchnią fazy stacjonarnej. Za elementy nowości naukowej w ocenianej rozprawie doktorskiej uważam:

- syntezę czterech nowych materiałów stanowiących fazy stacjonarne z wbudowaną grupą estrową lub fosfoestrową na nośniku diolowym, których struktura została potwierdzona za pomocą metod instrumentalnych;
- wprowadzenie nowych grup hydrofobowych oraz powiązanie zwykle stosowanych, znanych grup hydrofobowych poprzez nowe, hydrofilowe „łączniki” do struktury fazy stacjonarnej;
- wykorzystanie obecności nieprzereagowanych grup diolowych na powierzchni żelu krzemionkowego, w celu zapewnienia dodatkowych polarnych centrów aktywnych, oraz

ligandów hydrofobowych, co pozwoliło na jednoczesne rozdzielenie związków o zróżnicowanej polarności w układach chromatograficznych RP i HILIC.

Po uważnej lekturze ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne pytania i uwagi:

- 1) W rozprawie doktorskiej oznaczenia analityczne w użyciu samej wody jako fazy ruchomej wykonano stosując detektory UV-Vis oraz refraktometryczny. Czy według Doktorantki byłoby to możliwe w przypadku np. spektrometru mas i jakie byłyby tu ewentualne ograniczenia?
- 2) Wyniki opisanych oznaczeń analitycznych (D3-D5) dotyczą elucji izokratycznej. Czy podejmowano również próby zastosowania elucji gradientowej i oceny stabilności fazy stacjonarnej?
- 3) W rozprawie doktorskiej wspomniano o zastosowaniu m.in. kolumny Diol-P-C18 do oznaczeń polarnych lipidów w mleku krowim oraz kolumny Amino-P-C18 do oznaczeń fosfolipidów w żółtku jaja kurzego. Czy zsyntetyzowane przez Doktorantkę fazy stacjonarne były stosowane w analizach takich próbek biologicznych, jak np. mocz, osocze lub surowica krwi?
- 4) W pracy D5 Doktorantka zwraca uwagę na problem asymetrii pików w przypadku użycia samej wody jako fazy ruchomej i sugeruje zastosowanie dodatku buforów. Jakie bufory, według Doktorantki, byłyby wskazane, aby zachować założenia „zielonej chromatografii”?
- 5) W pracach D3-D Doktorantka wspomina, że właściwości powierzchniowe nowo zsyntetyzowanych faz stacjonarnych wykazują stabilność w obecności samej wody jako fazy ruchomej. W jaki sposób oceniana jest ich stabilność?
- 6) Odnośnie układu redakcyjnego rozprawy doktorskiej, uważam, że byłby bardziej logiczny, gdyby rozdział zatytułowany *Cele pracy* został opisany po rozdziale *Problem badawczy*. Ponadto, pomocnym w lekturze rozprawy byłoby umieszczenie krótkiego (1-2 strony) wprowadzenia i podsumowania badań, które zostały przedstawione w załączonych kopiach publikacji, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

7) Rozprawa doktorska została bardzo starannie przygotowana pod kątem edytorskim, poza bardzo nielicznymi błędami tj.: kilka brakujących przecinków, podwójnych spacji, użycie słowa „wypływać” zamiast „wpływać” (str. 8), użycie wyrażenia „linii bazowa” zamiast „linia podstawowa”.

Powyższe uwagi nie wpływają na moją bardzo pozytywną ocenę rozprawy doktorskiej. Przeprowadzenie tak wielu badań i uzyskanie powyższych wyników niewątpliwie wymagały od Doktorantki rzetelnego zaplanowania każdego etapu badawczego, a przede wszystkim interdyscyplinarnej wiedzy z zakresu chemii analitycznej. Istotność badań przedstawionych w rozprawie doktorskiej miała również swoje odzwierciedlenie w uzyskaniu finansowania ze środków Narodowego Centrum Nauki: Grant Sonata 5 nr 2013/09/D/ST4/03807 oraz Preludium 12 nr 2016/23/N/ST4/0036.

Podsumowując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska w pełni odpowiada wymaganiom stawianym pracom doktorskim, według obowiązujących przepisów (art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017r. poz.1789) w związku z art. 179 ust. 1 z dnia 3 lipca 2018r.). Pani mgr Katarzyna Krzemińska spełnia warunki określone w ustawie o stopniach i tytułach naukowych, dlatego wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego celem uzyskania stopnia naukowego doktora.

Jednocześnie, na podstawie Uchwały nr 94/2023 dotyczącej kryteriów wyróżniania rozpraw doktorskich na Wydziale Chemii UMK w Toruniu, biorąc pod uwagę interdyscyplinarny charakter przeprowadzonych badań, ich wysoką wartość poznawczą, elementy nowości naukowej oraz duży potencjał aplikacyjny, a także fakt opublikowania wyników przeprowadzonych badań w wysoko klasyfikowanych czasopismach z dziedziny nauk chemicznych, wnoszę do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne o wyróżnienie ocenianej rozprawy doktorskiej.

Zakład Biofarmacji i Farmakokinetyki
dr hab. Renata Wawrzyniak


Adiunkt

