

Gdańsk, 2023-05-13

Recenzja

**rozprawy doktorskiej autorstwa mgr Krystiana Purgata zatytułowanej
„Wykorzystanie mikroekstrakcji w elektroforetycznej analizie moczu na zawartość
tiolaktonu homocysteinf'**

Techniki elektromigracyjne pozwalają na szybkie i wysoce wydajne rozdzielanie naładowanych elektrycznie składników mieszanin znajdujących się w stosunkowo małych objętościach próbki. Początek rozwoju technik elektromigracyjnych datuje się na drugą połowę XIX wieku kiedy to angielski fizyk Oliver Lodge opublikował wyniki pierwszych eksperymentów elektromigracyjnych w roztworach i żelach. W 1948 roku szwedzki biochemik Arne Wilhelm Kaurin Tiselius został laureatem Nagrody Nobla z chemii, za m.in. badania nad zjawiskami elektroforezy oraz adsorpcji. Stellan Hjerten, uczeń Arne Tiseliusa, w 1967 roku zaproponował zastosowanie kapilar o bardzo małych średnicach wewnętrznych co stało się początkiem współcześnie znanej elektroforezy kapilarnej, a w 1984 roku ukazała się pionierska praca japońskiego badacza profesora Shigeru Terabe proponująca elektroforetyczne rozdzielanie, poza związkami obdarzonymi ładunkiem, także obojętnych elektrycznie cząsteczek, z użyciem micelarnej elektrokinetycznej chromatografii. Tylko publikacje tego ostatniego wymienionego powyżej naukowca, m.in. w takich czasopismach jak Science, osiągnęły w literaturze światowej liczbę ponad 21 tysięcy cytowań a ich skumulowany współczynnik oddziaływania wynosi 79 (wg bazy Web of Science). Świadczy to niezbitnie o bardzo dużym zainteresowaniu badawczym technikami elektromigracyjnymi a także o istotnym potencjale innowacyjnym jaki za nimi stoi. Jednym z takich wyzwań poznawczych, które przyciąga uwagę wielu badaczy w tym Autora

recenzowanej dysertacji, jest najpoważniejsza prawdopodobnie wada technik elektromigracyjnych jaką stanowi stosunkowo niska, zwłaszcza w porównaniu do technik chromatograficznych, czułość analityczna. Spośród wielu podejść badawczych stosowanych do rozwiązania tego istotnego ograniczenia analitycznego, szczególne miejsce zajmują szeroko rozumiane techniki wzbogacania analitu w kapilarze, tzw. on-line preconcentration techniques. Innym kluczowym, z punktu widzenia bioanalizy aspektem badawczym jest etap przygotowania próbki gdzie nowoczesne techniki jak mikroekstrakcja są coraz powszechniej stosowane.

W ten obszar badawczy perfekcyjnie wpisuje się oceniana praca doktorska mgr. Krystiana Purgata wykonana pod kierunkiem dr hab. Pawła Kubalczyka, prof. UŁ, w Katedrze Chemii Środowiska, Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Jest podsumowaniem badań nad opracowaniem metod elektromigracyjnych z wykorzystaniem techniki elektroforezy kapilarnej do oznaczania tiolaktonu homocysteiny w materiale biologicznymi. Wyniki badań Doktoranta dotyczące bezpośrednio ocenianej dysertacji zostały opublikowane w dwóch artykułach oryginalnych w renomowanych czasopismach naukowych takich jak: *Molecules* i *Analytical Biochemistry*. Wyżej wymienione prace ukazały się w stosunkowo krótki przedziale czasu od 2020 do 2021 roku i w obu z nich Pan mgr Purgał jest pierwszym autorem co potwierdza istotną rolę oraz wiodące zaangażowanie Doktoranta w realizację badań oraz powstawanie publikacji. Całkowity dorobek publikacyjny Doktoranta to w sumie 7 prac (razem z dwiema stanowiącymi podstawę rozprawy doktorskiej) opublikowanych w prestiżowych czasopismach z listy Journal Citation Reports (JCR) o łącznym współczynniku wpływu blisko 30. Jest On pierwszym autorem w trzech z ww. siedmiu publikacji. Wyniki badań mgr. Krystiana Purgata były przedstawiane podczas krajowych i międzynarodowych konferencji zarówno w postaci wystąpień ustnych jak i prezentacji plakatowych. Doktorant był kierownikiem dwóch projektów finansowanych w ramach prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego. Brał udział w licznych szkoleniach, krótkoterminowym naukowym stażu zagranicznym oraz był laureatem nagrody podczas X Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej w Lublinie w 2018 roku za najlepszą prezentację ustną w ramach sesji młodych.

Rozprawa doktorska mgr. Krystiana Purgata napisana jest w języku polskim i ma układ klasycznej pracy doktorskiej. We wstępie obejmującym około 80 stron przedstawione zostały podstawowe informacje z zakresu właściwości fizykochemicznych i biochemicznych homocysteiny, przegląd metod wykorzystywanych do oznaczania tiolaktonu homocysteiny, podstawy elektroforezy kapilarnej ze szczególnym uwzględnieniem

aspektów czułości metody oraz opis ekstrakcja ciecz-ciecz jako kluczowego elementu przygotowania próbki do analizy z omówieniem wariantu techniki jakim jest mikroekstrakcja do pojedynczej kropli. W części eksperymentalnej poza spisem aparatury, odczynników, przygotowywanych roztworów znajduje się także opis kondycjonowania kapilar w trakcie prowadzonych badań. Następnie w części literaturowej można się zapoznać z dokładnym opisem opracowania procedur oznaczeń elektroforetycznych tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka wraz z krótkim omówieniem otrzymywanych na poszczególnych etapach postępowania analitycznego wyników. I tak w pierwszej kolejności przedstawione zostało opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą kapilarnej elektroforezy strefowej oraz mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej w układzie pomiarowym elektroforezy kapilarnej, następnie opracowanie procedury mikroekstrakcji do pojedynczej kropli realizowanej poza układem elektroforezy kapilarnej a ostatecznie opracowanie metody oznaczania tiolaktonu homocysteiny za pomocą elektroforezy strefowej z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli oraz wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego.

W konsekwencji przyjętej konwencji przedstawiania wyników, po części teoretycznej znajduje się siedmiostronicowy rozdział zatytułowany podsumowanie i wnioski końcowe. Wnioski przedstawione są w 9 zwięzłych punktach. Na bibliografię składają się 243 pozycje literaturowe, głównie publikacje anglojęzyczne w czasopiśmie z listy JCR opublikowane w ostatnich 10 latach.

Rozprawę uzupełniają streszczenia w języku polskim i angielskim, wykaz użytych skrótów i symboli oraz wykazy tabel i rysunków. Pracę doktorską kończy wykaz dorobku naukowego oraz pozostałych osiągnięć Doktoranta.

Podstawowym celem pracy było opracowanie i zoptymalizowanie metod oznaczania tiolaktonu homocysteiny w moczu człowieka z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej oraz mikroekstrakcji ciecz-ciecz. W ramach opracowywanych metod szczególną uwagę położono na kwestie czułości, jako że jest to słaba strona technik elektromigracyjnych z detekcją spektrofotometryczną i w związku z tym w literaturze istnieje wiele doniesień na temat możliwych sposobów poprawy czułości w CE. Jako technikę zatężania analitu bezpośrednio w kapilarze, zastosowano spiętrzanie na drodze wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego. W procedurze wykorzystano ekstrakcję do pojedynczej kropli realizowaną na dwa sposoby, tj. w układzie albo poza układem pomiarowym CE, Osiągnięcie celu pracy możliwe było poprzez zrealizowanie 1<01ejnych etapów polegających na opracowaniu procedury przygotowania próbki do przeprowadzenia mikroekstrakcji do pojedynczej kropli w układzie trójfazowym, doborze odpowiednich warunków ekstrakcji tiolaktonu homocysteiny z moczu, zastosowanie wprowadzania próbki do kapilary ze wzmocnieniem pola elektrycznego w procedurze z mikroekstrakcją do pojedynczej kropli w trybie off-line,, oraz zastosowanie opracowanej metody do oznaczania próbek biologicznych, tj. moczu.

Do wymiernych efektów prowadzonych badań Doktoranta opisanych w rozprawie nageżą:

_ opracowanie nowych elektroforetycznych metod oznaczania HTL w moczu człowieka, z wykorzystaniem mikroekstrakcji do pojedynczej kropli oraz techniki wprowadzania próbki ze wzmocnieniem pola elektrycznego,

_ pozwoliło to na zwiększenie czułości metody wyrażone współczynnikami wzmocnienia (SEFA) wynoszącymi od 100 dla metody off-/ine SDME-CZE do 340 razy dla metody on-line SDME-CZE,

_ w efekcie oznaczanie HTL w moczu człowieka nie wymaga procesu derywatywacji związku, co pozwala na skrócenie czasu analiz,

_ przeprowadzona walidacja metod i uzyskane jej pozytywne wyniki pozwalają zakładać, iż opracowana metoda mogłaby służyć do rutynowej analizy moczu pod kątem oznaczania zawartości

Nie bez znaczenia jest również, szczególnie mając na uwadze tzw. „zieloną chemię”, iż zaproponowane metody i procedury analityczne są niskokosztowe a także, jak większość praktycznie metod elektromigracyjnych, zużywają niewielkie ilości rozpuszczalników organicznych, zapewniając ich bezpieczny i przyjazny charakter dla środowiska.

W swoich badaniach mgr Purgał wykonał bardzo liczne i niezwykle drobiazgowo analizy służące do optymalizacji warunków ekstrakcji, podczas których porównywał nie tylko różne rodzaje rozpuszczalników organicznych ale także wpływ objętości próbki w fiolce czy wpływ rodzaju kwasu oraz jego stężenia na wydajność procesu ekstrakcji. Podobnie detalicznie opisane zostały kolejne kroki w badaniach dotyczące doboru warunków elektroforetycznego rozdzielania, ich optymalizacji a następnie walidacji metody elektroforetycznej. Odnośnie walidacji nasuwa się pytanie, skąd wzięła się wartość zakresu liniowości (str. 118 i ryc. 54) i czy gdyby zakres ten był rozszerzony o np. jeden rząd wielkości to czy dalej metoda spełniałaby kryteria liniowości? Czy Doktorant uwzględnił w trakcie wykonywania badań także inne parametry walidacyjne niż wymienione w dysertacji? Generalnie też nasuwa się sugestia aby w przyszłych badaniach oprzeć się na podejściu planowania eksperymentu (Design of Experiments, DOE), w którym przy wykorzystaniu odpowiednich algorytmów obliczeniowych można jednocześnie optymalizować kilka parametrów analitycznych przy konieczności wykonania ograniczonej eksperymentów. Na rysunku 48 przedstawiono wyniki doboru rodzaju fazy akceptorowej dla procesu mikroekstrakcji, na podstawie których określono kwas fosforowy (V) jako optymalny ze względu na wielkość poka powierzchni sygnału. Jednocześnie na tym samym rysunku praktycznie identyczną wielkość pola powierzchni sygnału, uzyskano dla kwasu mrówkowego. Jakie były powody dla których to roztwór kwasu fosforowego(V) uznano za faktycznie lepszy od roztworu kwasu mrówkowego. Podobne wątpliwości budzą wyniki optymalizacji stężenia kwasu fosforowego(V) przedstawione na rysunku 49. W odróżnieniu od Autora dysertacji dla recenzenta wcale nie jest takie oczywiste, że wybór stężenia kwasu równego 0,0045 mol/L jest najwłaściwszy z punktu widzenia procesu mikroekstrakcji a konkretnie wielkości pola powierzchni i precyzji. Z przedstawionych na rysunku wyników

intensywności pola powierzchni sygnału wraz z odchyleniami standardowymi wydaje się, że inne stężenia w zakresie od 0,002 mol/L do 0,005 mol/L również mogłyby spełniać oczekiwania. Prawdopodobnie posłużenie się testem statystycznymi pozwoliłoby na wyeliminowanie istotnie statystycznie różnych wyników. Jakiego było pochodzenie próbek moczu wykorzystanych w badaniach w przedstawionej pracy doktorskiej. Czy Doktorant próbował obliczyć i wykorzystać w swoich badaniach skorygowane pole powierzchni sygnału (corrected peak area) i jakby to mogło wpłynąć na obserwowane wyniki?

Powyższe uwagi i pytania nie wpływają na ogólną wartość merytoryczną pracy, którą oceniam bardzo wysoko. Praca doktorska mgr. Krystiana Purgata ma walory nowości i oryginalności naukowej. Dysertacja potwierdza wysoką wiedzę i umiejętności Kandydata do stopnia naukowego doktora nauk chemicznych. Rozprawa doktorska mgr. Krystiana Purgata spełnia warunki określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789 ze zm.) w związku z art. 179 ust 1 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 roku Przepisy wprowadzające ustawę — Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r, poz. 1669 ze zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę wnioskuję do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu Łódzkiego o dopuszczenie mgr Krystiana Purgata do dalszych etapów przewodu doktorskiego w dyscyplinie nauki chemiczne.

