



## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr farmacji **Marty JANCZURY**

pt: *Molekularnie drukowane sorbenty w oznaczaniu wybranych związków biogenych*  
z Zakładu Chemii Organicznej Wydziału Farmaceutycznego  
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego  
wykonanej pod kierunkiem dr hab. Piotra Lulińskiego jako promotora  
oraz dr Moniki Sobiech jako promotora pomocniczego.

Rozwój metod analitycznych, bazujących na zjawiskach fizykochemicznych doprowadził do obniżenia poziomu wykrywalności i oznaczalności oraz wzrostu precyzji pomiaru analizowanych indywidualów. Wykorzystanie do tego celu specyficznych detektorów i metodyk o unikatowych właściwościach daje gwarancję powtarzalnego oznaczania analitów na niskim poziomie stężeń (ppb czy ppt a nawet ppq). Ważnym czynnikiem determinującym skuteczność (m.in. precyzja, dokładność, powtarzalność) przeprowadzenia takich oznaczeń jest dobór i wybór metody przygotowania próbek, a w konsekwencji sorbenta/wypełnienia kolumny analitycznej w oznaczeniach chromatograficznych, czy/i kolumnienki do procesu ekstrakcji na granicy faz tj. ekstrakcji ciecz-ciało stałe (SPE).

Poszukiwanie nowej generacji adsorbentów o ściśle zdefiniowanych właściwościach zarówno powierzchniowych jak i strukturalnych stanowi ciągle wyzwanie zarówno dla badaczy jak i technologów. Ciągle bowiem istnieje duże zapotrzebowanie na różnego rodzaju sorbenty, które charakteryzują się dużą pojemnością sorpcyjną, dobrą stabilnością mechaniczną i solwolityczną, a zwłaszcza odpornością w szerokim zakresie pH, brakiem toksyczności i niską, jednostkową ceną ich wytwarzania. Wyjątkowo interesujące wydają się być nie tylko sorbenty z tzw. odciskiem molekularnym czy molekularnie drukowane sorbenty z ang. *molecularly imprinted polymers* (MIP). Chodzi o materiały o ściśle zdefiniowanej strukturze

porowatej (rozmiar porów i ich kształt, objętość, struktura szkieletu matrycy, grubość ścian, a w konsekwencji powierzchnia właściwa) i architekturze powierzchniowej (typ i liczba grup funkcyjnych). Wszystkie te parametry decydują o powinowactwie adsorbatów i właściwościach adsorpcyjnych tych materiałów. W ostatnim czasie coraz większe zainteresowanie badaczy budzą sorbenty „dedykowane”, o ściśle zdefiniowanym i kontrolowanej architekturze. Uwzględniając te czynniki, jest oczywiste, że może to mieć znaczący wpływ nie tylko na efektywność adsorpcji czy kinetykę procesu ale również na selektywność i jego odwracalność (tzw. odzysk).

Preparatyka, więc tego typu nowych, „dedykowanych” i selektywnych sorbentów typu MIP do analityki związków biologicznie aktywnych poprzez kształtowanie architektury i struktury porowatej od wielu lat realizowana jest przez Zespół dr hab. Piotra Lulińskiego, głównego promotora tego przewodu. Jest ona też dobrze opisana i udokumentowana w światowej literaturze. Materiały z tzw. odciskiem molekularnym czy molekularnie drukowane sorbenty do SPE czy jej zminiaturyzowanej formy (SPME) od lat stanowią przedmiot zainteresowania zarówno teoretyków jak i praktyków. Początki lat 90-tych ubiegłego stulecia to dynamiczny rozwój badań w tym obszarze, zapoczątkowany przez K. Mosbacha i M. Wolfa jak również K-S Boose, F. Šveca G. Bonn, V. Pichon czy A. Kettruppa. Nie można w tym miejscu nie wspomnieć, choć Pani potraktowała to trochę po macoszemu, o znaczącym udziale Polaków i ich wkładzie w rozwój zarówno techniki SPE/SPME jak i poszukiwaniu nowej generacji sorbentów (kierowana przeze mnie grupa lubelsko-toruńska czy p. prof. Barbara Gawdzik z UMCS, jak też osoba prof. J. Pawliszyna, której w tym miejscu nie sposób pominąć). No ale rozumiem, że takie czynniki jak młodzieńczy pęd do wiedzy i bogata literatura nie pozwoliły Pani na dotarcie do wspomnianych przeze mnie autorów fundamentalnych pozycji literaturowych.

Analizując treść wytyczonych przez Promotorów i Doktorantkę celów i zadań nie mam najmniejszej wątpliwości, że tematyka jest ważna, ciekawa, wielowątkowa i stanowi nowe podejście zarówno koncepcyjne jak i metodyczne, mieszczące się w kanonie wymaganej „nowości naukowej”. Wykorzystanie zaplecza i potencjału syntetycznego, aparatu instrumentalnego bazującego na fizykochemicznej charakterystyce powierzchniowej i strukturalnej otrzymanej serii adsorbentów gwarantuje precyzyjny opis właściwości tych materiałów oraz potencjalne ich zastosowania w różnych wariantach oznaczeń analitycznych. Zagadnieniom tym poświęcona jest niniejsza dysertacja, w której Autorka słusznie zauważa, że tylko

wielokierunkowe i interdyscyplinarne podejście do tych ważkich i trudnych zagadnień pozwoli opisać i zrozumieć naturę i właściwości a w konsekwencji przebiegające mechanizmy z zastosowaniem spreparowanych materiałów.

Ocenianą dysertację stanowi zwarte opracowanie, podzielone na kilka części. Przy czym Autorka starała się skonstruować ją tak aby zachować i spełnić wymagane przepisy. Część pierwsza to 50-cio stronicowy **autoreferat**, w którym przedstawione zostały informacje na temat aktualnego stanu wiedzy, oraz krótkie scharakteryzowanie problemu, który stanowił nadrzędny cel badań. Dalej to postawione przez p. Promotorów i Doktorantkę **cele** oraz **wyzwania**. Następnie omówiono krótko najważniejsze **uzyskane wyniki** oraz **powstałe opracowania** metodyczne i w konsekwencji wytyczonego planu. Całość spinają **wnioski** oraz plik **kopii publikacji** (załączniki), na podstawie których oceniana dysertacja powstała. Do tego należy dodać **inne dokumenty uzupełniające** całość tj. **bibliografia** (74 pozycje) oraz wykaz skrótów i akronimów. Opracowanie zawiera również wykaz dorobku naukowego Doktorantki oraz streszczenie w języku polskim i angielskim. Ponadto w pliku dokumentów są również oświadczenia Autorki jak i współautorów co do zakresu wykonanych przez nich zadań. Dokumentacja więc jest kompletna i nie budzi zastrzeżeń pod względem formalnym.

Zasadniczą treść rozprawy doktorskiej stanowi cykl monotematycznych 4-ch prac naukowych, opublikowanych w specjalistycznych czasopismach z tzw. *listy JCR*. Analizując stanowiące ekwiwalent rozprawy doktorskiej publikacje należy stwierdzić, że są to prace trój- i czteroautorskie głównie z promotorami, gdzie Doktorantka jest pierwszym autorem w 3 z nich. Analizując, zamieszczone w dokumentacji tzw. oświadczenia współautorskie nie ma najmniejszej wątpliwości, że udział Doktorantki był dominujący. Z treści tych oświadczeń wynika, że odgrywała Ona kluczową rolę w realizacji badań, i aktywnie uczestniczyła w przygotowaniu manuskryptów, ich planu, wypracowania koncepcji oraz realizacji ujętych harmonogramem badań. Podobnie domniemać można, że to właśnie na Doktorantce spoczywała interpretacja uzyskanych wyników. Prace te są bardzo aktualne i „młode, powstały bowiem w 2021 roku. W tym miejscu należy dodać, że prace te przeszły już zarówno formalną jak i merytoryczną ocenę przez co najmniej 3 - 4 niezależnych, międzynarodowych ekspertów powołanych przez edytora czasopism. Chęć konfrontacji swoich osiągnięć w specjalistycznych czasopismach

(*Materials, Polymer Testing, J. Molec. Sci., Internat. J. Molecul. Sci.*,) dobrze świadczy o p. Promotorach i Doktorantce. Wyniki tych badań były też przedmiotem prezentacji, w różnych formach, na konferencjach i sympozjach naukowych.

**Część teoretyczną** rozprawy stanowią rozważania zawarte w pracy **P-1**. To wielowątkowe kompendium wiedzy na temat zasadniczego nurtu pracy odnoszącego się do nowej generacji sorbentów z odciskiem molekularnym na bazie polimerów, ich syntezą/preparatyką, charakteryzacją i opisem właściwości porowatych, strukturalnych i powierzchniowej architektury. Autorka zwróciła też uwagę na potencjalne mechanizmy jakie mogą przebiegać pomiędzy analitem a spreparowanym sorbentem. Szkoda, że słabo uwypukliła Pani udział oddziaływań supramolekularnych w transferze masy w procesach izolowania, wzbogacania i oczyszczania analitów (SPE-HPLC). To dobrze napisana praca przeglądowa, wprowadzająca czytelnika w obszar tematyczny. Zauważone mankamenty, co do nienajlepszego doboru referencji, już wcześniej zasygnalizowałem. Szczególnie uwidacznia się to w rozważaniach zamieszczonych na str. 21 i 22 **autoreferatu**. Polemizowałbym też z wielokrotnością użycia MIP-SPE materiałów, w kontekście analizy związków biologicznie aktywnych czy procesu sorpcji, a zwłaszcza tzw. sorpcji nieodwracalnej. Efekty te mają znaczący udział w mechanizmach odpowiedzialnych za opis procesu i odzysk. No ale to materiał na dyskusję, którą mam nadzieję podejmiemy podczas publicznej obrony.

Praca druga (**P-2**) to opis wyników doboru i wyboru najlepszych warunków syntezy sorbentów do SPE na bazie polimerów otrzymanych z monomerów (9), o charakterze kwasowym (kwas akrylowy i metakrylowy) i zasadowym (trzecio- i drugorzędowe aminy) z odciskiem kwasu 4-hydroksy-3-nitrofenylooctowego (NHPA) (sorbenty MIP) oraz 9 materiałów bez tzw. odcisku cząsteczkowego (NIP). Synteza/polimeryzacja tych materiałów prowadzona była w bloku. Dalej Autorka przebadala i opisała właściwości sorpcyjne spreparowanych sorbentów. Wyznaczyła izotermy adsorpcji dla: 2-(hydroksyfenylo)etanolu, 2-nitrofenolu, 3-chloro-L-tyrozyny i dopaminy zarówno wg. modelu Langmuir'a jak i Freundlich'a. Określiła pojemności sorpcyjne ( $B$ ) oraz współczynnik podziału ( $K_D$ ), które porównała dla materiałów MIP i NIP (selektywność). Z przeprowadzonych badań wynika, że materiał na bazie kopolimeru kwasu akrylowego z dimetakrylanem glikolu etylowego posiadał najlepsze parametry charakteryzujące pojemność sorpcyjną, współczynnik podziału oraz odzysk. Ma to swoje przełożenie na

selektywność. Ponadto Doktorantka wyznaczyła niezwykle interesujący i użyteczny parametr Scatchard'a, odpowiedzialny za jednorodność rozmieszczenia grup funkcyjnych na powierzchni adsorbentów. Parametr ten dobrze koresponduje ze specyficznością i niespecyficznością centrów aktywnych, odpowiedzialnych za procesy sorpcyjne. Nie jest więc odkrywczym stwierdzenie, że materiały typu NIP charakteryzują się wyłącznie niespecyficznymi centrami aktywnymi. A jakie miałyby być? Ciekawe i bardzo inspirujące w dyskusji są rozważania na temat heterogeniczności porowatej i strukturalnej otrzymanych materiałów. To dobrze dobrana i zrealizowana część systematycznych badań. Zawarte w konkluzjach wnioski nie budzą zastrzeżeń recenzenta. Wprawdzie ciśnie się pytanie nt powtarzalności syntez i odtwarzalnością struktur?! Z tego typu materiałami niestety są problemy. Jest to dobry temat do polemiki i dyskusji. Innym ważnym zastrzeżeniem są sprawy nomenklaturowe. Skoro pisze Pani, że **optymalizowała** Pani proces, OK, to jaką metodę statystyczną Pani użyła? Ja skłaniałbym się do sformułowania **dobór/wybór**. Dobrze byłoby skorygować niektóre nazwy i terminy z hasłami przytoczonymi w opracowaniu wydanym pod red. E. Śliwki i Z. Witkiewicza (PWN, 2016 r) *Chromatografia i techniki elektromigracyjne. Słownik pięcioletni*.

Kolejna praca (**P-3**) poświęcona jest opisowi syntezy serii materiałów sorpcyjnych z odwzorowaniem analogów strukturalnych NHPA. Dalej Autorka poddała ocenie, charakteryzacji i analizie tych materiałów. Następnie dokonała doboru warunków procesu ekstrakcji w układzie ciecz-ciało stałe i oznaczaniu analogów NHPA z użyciem LC-MS/MS, wyizolowanych z realnych próbek moczu ludzkiego za pomocą wypełnień do MIP-SPE. Materiały były syntetyzowane metodą polimeryzacji w bloku z wykorzystaniem odwzorowania molekularnego typu *pseudo-template strategy* (metoda **wytrycha** a nie **klucza-zamka**, chodzi o szablon). Okazało się, że otrzymane materiały z powodzeniem można wykorzystać do opracowania oryginalnego protokołu izolowania i oznaczania NHPA i analogów z użyciem dedykowanych pseudo-szablonowych materiałów typu MIP z odciskiem uzyskanym z użyciem kwasu 4-hydroksy fenylooctowego. Tu jednak jak bumerang wraca nadmierne i nieupoważnione użycie określenia **optymalizacja** i to w różnym kontekście (synteza, dobór warunków SPE, HPLC, MS, *ect*). Trzeba to zweryfikować i unikać *slangu*.

Czwarta praca (**P-4**) to opis studiów dotyczących oznaczaniu tyraminy i jej pochodnych w warunkach klinicznych z zastosowaniem tzw. magnetycznych sorbentów z odwzorowaniem molekularnym. Tego typu materiały z dobrą skutecznością i selektywnością rekomendowane

są do izolowania śladowych ilości aktywnych biologicznie indywiduów, które mogą ulegać interferencji podczas izolowani z supernatantów. Dodatkowy czynnik jakim jest pole magnetyczne poprawia odzysk i skuteczność izolowania i oznaczania. Zastosowanie materiałów z rozmieszczonymi homogenicznie w powierzchniowej warstwie ferromagnetycznymi (rdzeń-powłoka) ugrupowaniami zapewnia dobry wynik analizy. Zsyntetyzowane materiały, choć tu już Pani nie podaje detali (być może chodzi o tajemnice patentową), poddane zostały standardowej metodzie charakteryzowania i opisu utworzonych struktur. Wyznaczono izotermy i parametry charakterystyczne (deskryptory) odnoszono do zastosowanego w opisie kinetyki modelu Ho-McKay. Uzyskane sorbenty, po etapie kalibracji i walidacji, wykorzystano do oznaczania tyraminy i jej pochodnych w produktach spożywczych (piwo, czekolada, kawa).

Za najważniejsze osiągnięci naukowe mgr Marty Janczury należy uznać:

1. opracowanie serii oryginalnych, selektywnych i dedykowanych sorbentów z tzw. odciskiem molekularnych do izolowania, oczyszczania i wzbogacania biologicznie aktywnych substancji ze złożonych matryc rzeczywistych,
2. wykorzystanie różnych technik fizykochemicznego do charakteryzowania struktury otrzymanych materiałów sorpcyjnych z uwzględnieniem opisu porowatości i zdolności adsorpcyjnych ale też próba opisu jednorodności i lokalizacji centrów aktywnych na powierzchni adsorbentów,
3. próba opisu procesów przebiegających na granicy faz (adsorpcja, ekstrakcja, chromatografia, ect) z wykorzystaniem dostępnych opracowań i rozwiązań teoretycznych,
4. opracowanie i zaproponowanie skalibrowanych i zwalidowanych i kompleksowych, oryginalnych metodyk analitycznych (MIP-SPE-LC-MS/MS) do oznaczania biologicznie aktywnych substancji w próbkach rzeczywistych z opisem mechanizmu przemian i konwersji.

Recenzent jest pod wrażeniem wykonanej pracy jej solidności i formy prezentowanych danych. Mam jednak jeszcze kilka pytań:

1. nigdzie Pani nie dyskutuje wpływu struktury porowatej (myśle tu o kształcie i rozmiarze porów) uzyskanych materiałów, na tzw. wymianę mas, istotną w SP i w technikach separacyjnych. Czy mogłaby Pani się odnieść do tej kwestii?

2. czy nie myślała Pani o chemicznej modyfikacji centrów aktywnych/grup funkcyjnych, jako dodatkowego, poprawiającego selektywność czynnika,
3. metody relacji MIP-NIP są we wszystkich przypadkach metodami pośrednimi Czy nie zastanawiała się Pani nad metodami bezpośrednimi np. GPC?

Przedstawione przeze mnie uwagi są elementem dyskusji i dlatego poddaję je polemice mając nadzieję na uzyskanie odpowiedzi oraz wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony. Jednocześnie stwierdzam, że uwagi te i wątpliwości nie mają wpływu na pozytywną, merytoryczną wartość ocenianej dysertacji. W tym miejscu należy stwierdzić, że założony przez Państwa Promotorów i Doktorantkę **cel** został **osiągnięty**. Opracowane metodyki stanowią nowość oznaczeń analitycznych za pomocą łączonych technik, które z łatwością można adaptować dla potrzeb oznaczeń rutynowych.

Uważam, że w świetle obowiązujących przepisów (Ustawa z dnia 20 lipca 2018 r *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*), a w szczególności artykuły i przepisy; *O stopniach naukowych i tytule naukowym* wraz z uzupełnieniami, przedstawiona rozprawa spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę o dopuszczenie p. **mgr farm. Marty Janczury** do dalszych etapów postępowania celem uzyskania stopnia **doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu** w dyscyplinie **nauk farmaceutycznych**.

Praca swoją tematyką i zakresem oraz nowatorskimi rozwiązaniami metodycznymi jak też użytecznością i możliwością transferu tych opracowań dla potrzeb rutynowych oznaczeń (4-y publikacje naukowe wydane zostały w bardzo dobrych, specjalistycznych czasopismach z tzw. *listy JCR i MEiN*), spełnia ogólnie przyjęte reguły i zalecenia. Biorąc pod uwagę wymagania stawiane tego typu rozprawom z pełnym przekonaniem wnoszę do Rady Dyscypliny Wydziału Farmaceutycznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o jej **wyróżnienie**.

Stary Toruń 31 styczeń 2022 r.

  
prof. zw. dr hab. Bogusław Buszewski, dr h.c. mult.