



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
Z ODDZIAŁEM MEDYCYNY LABORATORYJNEJ

Zakład Bromatologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel./Fax. (85) 748-54-68; (85) 748-54-69

bromatos@umb.edu.pl

Białystok 21 lipca 2020 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Moniki Joanny Turkowicz pt.:
„Zastosowanie reakcji derywatyzacji do opracowania nowych procedur oznaczania
kwasu liponowego”

Kwas liponowy należy do naturalnych związków przeciwutleniających, któremu przypisuje się szereg korzystnych właściwości. Jego główną funkcją jest usuwanie z organizmu reaktywnych form tlenu a także regeneracja innych ważnych antyoksydantów, takich jak witamina C, witamina E, koenzym Q10 i glutation. Wpływa na poprawę funkcji mitochondriów, wspomaga metabolizm tłuszczów i węglowodanów, wykazuje również działanie przeciwzapalne oraz poprawia funkcję układu immunologicznego. Związek ten wykorzystuje się m.in. we wspomaganiu leczenia cukrzycy, szczególnie typu 2, marskości wątroby, chorobach układu sercowo-naczyniowego oraz schorzeniach neurologicznych, takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, migreny czy stwardnienie rozsiane. Znalazł również zastosowanie w kosmetologii, ze względu na silne działanie przeciwutleniające, przede wszystkim jako składnik preparatów przeciwstarzeniowych. Wykorzystywany jest także przez sportowców do regeneracji mięśni po wysiłku. Badania wykazały także jego właściwości odtruwające. Kwas liponowy może chronić wątrobę, nerki i układ nerwowy przed szkodliwym działaniem pierwiastków toksycznych, posiada zdolność ich wiązania i usuwania z organizmu.

Organizm człowieka posiada zdolność syntetyzowania tego związku, ale jest on także obecny w produktach spożywczych, gdzie występuje w niewielkiej ilości, znacznie wyższe jego zawartości dostępne są w postaci suplementów diety. Pomimo wykazanych korzystnych właściwości kwasu liponowego nie jest ustalona jego referencyjna wartość spożycia, gdyż istnieje pogląd, że zdrowy organizm jest zdolny do wytwarzania jego wystarczającej ilości. Jako związek naturalnie występujący w organizmie jest dobrze tolerowany, wykazuje niewielką toksyczność, jednak długotrwałe przyjmowanie wysokich dawek (300-600 mg) w postaci suplementów diety może wywoływać działania niepożądane.

Rozwój nowoczesnych metod analitycznych, a jednocześnie coraz większa wiedza na temat znaczenia poszczególnych składników w żywieniu człowieka, często występujących w minimalnych ilościach, stwarza konieczność poszukiwania nowych, czułych i uniwersalnych metod oznaczania takich związków.

WPLYNĘŁO DO DZIEKANATU

Białystok, dnia 21.07.2020

W związku z powyższym podjęty przez Panię mgr Monikę Joannę Turkowicz temat rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej było opracowanie nowej, przydatnej analitycznie metody oznaczania kwasu liponowego.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. n. med. Joanny Karpińskiej. Rozprawa ma formę monografii (148 stron maszynopisu) i składa się z dwóch zasadniczych części – teoretycznej, wprowadzającej do tematu oraz eksperymentalnej. W pierwszej części Doktorantka przedstawiła charakterystykę kwasu liponowego, jego właściwości fizyczne i chemiczne. Następnie omówiła rolę kwasu liponowego w organizmie, jego funkcje biologiczne, metabolizm, przedstawiła dane literaturowe dotyczące możliwości wykorzystania kwasu liponowego w przebiegu różnych schorzeń a także sposoby otrzymywania kwasu liponowego oraz występowanie w produktach spożywczych. Kolejny podrozdział części teoretycznej poświęcony jest analityce kwasu liponowego, w którym doktorantka szczegółowo omawia dotychczasowe metody analityczne oznaczania kwasu liponowego, ich stosowalność, zalety oraz wady. Omówione są metody ekstrakcji, derywatyzacji, a następnie poszczególne techniki analityczne rozdziału i detekcji tego związku.

Cele szczegółowe rozprawy doktorskiej obejmują: 1. Zbadanie przebiegu reakcji derywatyzacji kwasu liponowego z jodkiem 2-chloro-1-metylopirydyniowym (CMPI), 2,4'-dibromoacetofenonem (DBAF), tetrafluoroboranem 2-chloro-1-metylochonolinowym (CMQT) oraz alkoholem 4-metoksybenzylowym (4-MBA); 2. Identyfikację otrzymanych produktów reakcji derywatyzacji z zastosowaniem analizy spektralnej ^1H NMR, IR, UV oraz MS; 3. Opracowanie nowych procedur oznaczania kwasu liponowego z zastosowaniem wymienionych odczynników derywatyzujących techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV i chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS); 4. Ocenę analitycznej przydatności opracowanych procedur, w tym ustalenie zakresu liniowości, współczynnika determinacji, powtarzalności, granicy wykrywalności (LOD), granicy oznaczalności (LOQ); 5. Sprawdzenie praktycznego wykorzystania opracowanych metod oznaczania kwasu liponowego w produktach spożywczych i suplementach diety. Badania zostały przeprowadzone na wybranych produktach spożywczych, takich jak ziemniaki, szpinak, brokuły, błonnik jabłkowy, młody jęczmień, piwo oraz dwóch komercyjnie dostępnych suplementach diety z zawartością kwasu liponowego 300 i 100 mg w jednej kapsułce.

Zarówno cel główny pracy, jak i postawione cele szczegółowe zostały zrealizowane. Zastosowana w pracy metodyka nie budzi wątpliwości, wszystkie opracowane metody zostały poddane walidacji, uzyskano zadowalające odzyski metodą dodatku wzorca, a także dużą zgodność uzyskanej zawartości kwasu liponowego w badanych suplementach diety z wartością deklarowaną przez producentów, co wskazuje na wysoką jakość opracowanych metod i duże doświadczenie analityczne Doktorantki.

Uzyskane wyniki badań przedstawiono na 20 tabelach i 13 starannie przygotowanych rycinach.

Omówienie i dyskusja otrzymanych wyników zostały opracowane w jednym rozdziale, co ze względu na charakter rozprawy, której głównym celem jest opracowanie nowych metod analitycznych, jest w moim przekonaniu zasadne. Jednak niektóre elementy umieszczone w wynikach pracy, które bardziej wskazują na zastosowaną metodologię badań, np. parametry analityczne poszczególnych metod, mogły być umieszczone wcześniej – w rozdziale „Materiał i metodyka badań”.

W podsumowaniu wyników i wnioskach Doktorantka podkreśliła, że w prezentowanej rozprawie doktorskiej zastosowała zaproponowane odczynniki derywatyzujące po raz pierwszy, nie wykorzystywane do tej pory w analizie kwasu liponowego (CMPI, CMQT, DBAF oraz 4-MBA). Sprawdzony został przebieg redukcji kwasu liponowego/kwasu dihydroliponowego z tymi odczynnikami oraz przeprowadzono ocenę przydatności analitycznej nowo otrzymanych pochodnych. Nowo opracowane procedury spektrofotometrycznego oraz chromatograficznego oznaczania kwasu liponowego poddano walidacji. Przydatność powyższych metod potwierdzono poprzez oznaczenie zawartości kwasu liponowego w produktach spożywczych i suplementach diety. Zoptymalizowano etap ekstrakcji, derywatywacji oraz etap oznaczania chromatograficznego. Uzyskanie nowych związków potwierdzono wykonując analizy spektralne ^1H NMR, IR, UV oraz MS. Porównano otrzymane wyniki zawartości kwasu liponowego w produktach spożywczych z danymi literaturowymi. Rozbieżność wyników eksperymentalnych i danych z piśmiennictwa, jak słusznie zauważyła Doktorantka, może wynikać z różnych źródeł pochodzenia materiału do badań, różnic gatunkowych oraz warunków klimatycznych, z których pochodziły próby.

Na końcu dysertacji dołączone jest streszczenie w języku polskim i angielskim. W pracy zacytowano 217 pozycji poprawnie dobranej literatury, w tym 88% pozycji anglojęzycznych. Jednak omawiając zastosowanie kwasu liponowego w kosmologii powinno być zacytowane piśmiennictwo 43 zamiast 44, w którym wspomniane jest jedynie o przeciwdziałaniu omawianego związku na skórę w przypadku ekspozycji na promieniowanie UVB, przy czym zacytowane są w tej publikacji prace źródłowe.

W suplemencie rozprawy doktorskiej zamieszczono przykładowe widma IR oraz NMR otrzymanych związków.

Na uwagę zasługuje estetyka przygotowanej dysertacji - staranne, czytelne ryciny i tabele ułatwiają czytającemu przeanalizowanie najważniejszych rezultatów z wykonanych badań. Z obowiązku recenzenta zamieszczam kilka uwag:

- w wykazie skrótów do detekcji elektrochemicznej lepiej było przyjąć jeden skrót, podobnie skróty przepływowej analizy wstrzykowej FI, FIA są wytłumaczone nieprecyzyjnie – tłumaczenie analiza przepływowa (flow analysis) sugerowałoby skrót FA, wyżej wymienione skróty oznaczają odpowiednio flow injection/flow injection analysis;
- na str. 15 styl pisanie grupy karboksylowej we wzorach chemicznych na rys. 1 i 2. należałoby ujednolicić;
- drobne błędy literowe i stylistyczne (np. str. 14, 65, na str. 29 – należałoby unikać sformułowań „jak już wcześniej wspomniano”);

- str.33/34 przy informacji dotyczącej produkcji kwasu liponowego w różnych krajach brakuje odniesienia literaturowego;
 - na str.36 powinno być: „absorbowałby promieniowanie w zakresie UV-VIS”;
 - pojęcie „farmaceutyki” (str. 41) jest sformułowaniem potocznym, funkcjonującym z zapożyczenia z języka angielskiego, poprawniej byłoby użyć: środki/preparaty farmaceutyczne lub produkty lecznicze;
 - w celu pracy na str. 57 zamiast oznaczania kwasu liponowego w próbkach biologicznych należałoby użyć w „środkach spożywczych”, do których należą również badane suplementy diety. Próbkę biologiczną, do których zalicza się np. krew, tkanki, mocz, nie były przedmiotem badań w niniejszej rozprawie;
 - na str. 65 w opisie procedury przygotowania prób Doktorantka podaje, że pozbywano się z masy tabletkowej, tymczasem przedmiotem badań były kapsułki – inna postać farmaceutyczna. Właściwiej byłoby napisać, że pozbywano się substancji pomocniczych.
 - na str. 89 przy informacji, że w przypadku analizy żywności wpływ na zawartość oznaczanego analitu może mieć odmienna partia produktu, czas przechowywania, a także warunki środowiskowe i klimatyczne rejonu, z którego pochodzą składniki środków spożywczych – należałoby zacytować stosowne piśmiennictwo.
 - użyte na str. 113 oraz w celu pracy sformułowanie „środki farmakoterapii” powinno być zamienione na „środki stosowane do farmakoterapii” lub „środki farmaceutyczne”;
 - wykaz literatury należałoby ujednolicić, np. cytowanie tytułów publikacji, gdzie w niektórych przypadkach poszczególne wyrazy zaczynają się od dużych liter, niepotrzebnie podawane są miesiące publikacji, w pozycjach 13 i 74 brakuje autorów publikacji a w pozycjach 159 i 160 wydawnictwa i miejsca wydania.
- Powyższe drobne uchybienia w tekście dysertacji nie mają wpływu na jej wysoką jakość i wartość praktyczną rozprawy doktorskiej.

Załączony dorobek publikacyjny, obejmujący 14 publikacji o łącznym współczynniku IF = 16,674 oraz 11 streszczeń konferencyjnych potwierdza naukową dojrzałość Doktorantki, co znajduje odzwierciedlenie w starannym, przemyślanym podsumowaniu wyników dysertacji i formułowaniu wniosków. Na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka w latach 2011-2016 była kierownikiem projektu NCN Preludium, którego rezultatem są m.in. wyniki niniejszej rozprawy doktorskiej.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane z badań wyniki i wnioski niewątpliwie posiadają aspekt praktyczny. Realizacja badań wymagała od Doktorantki dużego nakładu pracy i pełnego zaangażowania w realizowane badania. Uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia ustawowe, z uwzględnieniem art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu w Białymstoku o dopuszczenie Pani mgr Moniki Joanny Turkowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

KIEROWNIK
Zakładu Bromatologii

K. Socha
dr hab. n. farm. Katarzyna Socha