

Rzeszów, 10.09.2015 r.

Prof. dr hab. inż. Jan Kalembkiewicz  
Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Rzeszowska

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr MARTY HRYNIEWICKIEJ

na temat:

Zastosowanie nowych technik ekstrakcyjnych do analizy wybranych związków  
o działaniu hipolipemicznym

wykonanej w Zakładzie Chemii Ogólnej i Nieorganicznej Instytutu Chemii (Wydział  
Biologiczno – Chemiczny) Uniwersytetu w Białymstoku  
Promotor pracy - dr hab. Barbara Starczewska, prof. UwB

Rozwój cywilizacyjny człowieka związany z nowymi generacjami materiałów o działaniu biologicznym, wytwarzanych na wzór substancji pochodzenia naturalnego, a zwłaszcza ich analiza w tych obiektach i produktach naturalnych stwarza nowe wyzwania w zakresie kontroli analitycznej. Na styku dwóch zasadniczych i jakże ważnych współcześnie problemów nierozwiązanych skutecznie do tej pory, tj. niekontrolowanej analitycznie obecności szeregu związków o działaniu hipolipemicznym w naszym otoczeniu i ograniczonych możliwościach ich analizy ilościowej ze względu na brak procedur została zrealizowana praca doktorska.

Analiza składników w materiałach złożonych, a do takich należą farmaceutyki, suplementy diety, jak również materiały pochodzenia naturalnego jest procesem wieloetapowym, z głównymi etapami pobrania i przechowywania materiału do badań, przygotowania próbki do oznaczeń w tym wydzielenia i zagęszczenia analitu, oraz oznaczenia. O ile dwa skrajne etapy analizy są w znacznym stopniu znormalizowane procedurami pobierania próbek i wykonania pomiaru określoną techniką, tak wydzielenie i zagęszczanie analitów z materiałów o bogatej matrycy jest najtrudniejszym etapem w procedurze analitycznej, zwłaszcza w analizie śladów i mikrośladów. Dotychczasowa praktyka wskazuje, że techniki ekstrakcyjne stanowią skuteczny instrument wydzielenia selektywnego lub grupowego analitów ze złożonego materiału i zagęszczania ich przed oznaczeniem ilościowym.

Tematyka rozprawy doktorskiej, zgodnie z jej tytułem, dotyczy zastosowania nowych technik ekstrakcyjnych do analizy wybranych związków o działaniu hipolipemicznym. Problemowi temu, tj. poznaniu i opracowaniu warunków wydzielenia, izolacji i wzbogacania analitów przy zastosowaniu nowych technik ekstrakcyjnych, a także opracowaniu procedur analitycznych poświęcona jest praca doktorska. Obiektem badań były związki z grupy statyn i fitosteroli, techniki ekstrakcyjne do ich wydzielenia i zagęszczania w skali mikro oparte o

różne mechanizmy podziału substancji i rozwiązania techniczne, oraz procedury analityczne z detekcją analitu łącznie.

Praca doktorska złożona jest z 10 rozdziałów, ułożonych logicznie, obejmujących: wstęp, część literaturową, cel i zakres pracy, badania własne, podsumowanie i wnioski. W skład pracy wchodzi także spis skrótów i akronimów, 57 rysunków i 76 tabel, spis literatury (230 pozycji), spis rysunków i tabel oraz wykaz osiągnięć naukowych.

Cele główne i szczegółowe rozprawy doktorskiej zostały sformułowane w sposób przejrzysty, i obejmowały (i) zbadanie i opracowanie ekstrakcyjnych procedur wydzielania, wzbogacania i rozdzielania wybranych statyn (4 statyny: lowastatyna, fluwastatyna, atorwastatyna i rosuwastatyna) oraz  $\beta$ -sitosterolu (fitosterol) z roztworów, oraz (ii) opracowanie procedur analitycznych statyn i  $\beta$ -sitosterolu na bazie ekstrakcyjnego ich wydzielania i zagęszczania. Tak sformułowane cele badań były istotne zarówno ze względów poznawczych jak i praktycznych.

Część teoretyczną pracy stanowi przegląd literaturowy w zakresie trzech tematów powiązanych ze sobą ze względu na prowadzony eksperyment, tj.: (i) statyn i fitosteroli, (ii) technik ekstrakcyjnych wydzielania analitów, oraz (iii) chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas stosowanej do oznaczania statyn i fitosteroli. Przegląd literaturowy jest obszerny (57 stron), oparty na współczesnej literaturze naukowej, głównie międzynarodowej. Znacząca część przeglądu poświęcona jest technikom ekstrakcyjnym stosowanym do wydzielania i oddzielania śladów. W tej części opracowania Autorka stwierdza, że w praktyce najczęściej wykorzystywanymi technikami wydzielania statyn i fitosteroli są: klasyczna ekstrakcja cieczowa (LLE) oraz ekstrakcja do fazy stałej (SPE), oraz że wprowadzenie nowoczesnych technik wydzielania związków (w tym ekstrakcji micelarnej oraz ekstrakcji do punktu zmętnienia, ekstrakcji z wykorzystaniem wirującego elementu sorpcyjnego, mikroekstrakcji dyspersyjnej), może przynieść nowe rozwiązania w zakresie m.in. zagęszczania analitu, selektywności procesu, redukcji zużycia toksycznych rozpuszczalników i miniaturyzacji procesu.

W części teoretycznej pracy dokonano krytycznego spojrzenia na dane literaturowe w zakresie stosowanych dotychczas technik ekstrakcyjnych, co jest bardzo cenne, ponieważ pozwoliło Autorce rozprawy na tym etapie rozpoznawania problemu naukowego stwierdzić różne podejścia do problemu wydzielania i rozdzielania analitów oraz rozpoznać różne często bardzo szczegółowe rozwiązania. Podkreślić należy, że Autorka pracy z tym problemem poradziła sobie bardzo rozważnie i skutecznie.

### **Część doświadczalna**

Część doświadczalna pracy poświęcona jest badaniom nowych technik ekstrakcyjnych do wydzielania i wzbogacania analitów z grupy statyn (lowastatyna, fluwastatyna, atorwastatyna i rosuwastatyna) oraz fitosteroli ( $\beta$ -sitosterol) z roztworów. Część doświadczalna pracy poświęcona jest także opracowaniu końcowych procedur analitycznych analizy statyn i  $\beta$ -sitosterolu z udziałem zoptymalizowanych technik ekstrakcyjnych, i ich zastosowaniu do analizy badanych związków w produktach spożywczych różnego pochodzenia, suplementach diety oraz wodzie i ściekach.

W badaniach wydzielania i zagęszczania statyn i  $\beta$ -sitosterolu zastosowano łącznie 8 technik ekstrakcyjnych, w tym: ekstrakcję micelarną (ME), ekstrakcję do punktu zmętnienia (CPE), ekstrakcję z użyciem wirującego elementu sorpcyjnego (SBSE), ekstrakcję do fazy

stałej (SPE) – w zakresie wydzielania statyn, oraz mikroekstrakcję dyspersyjną ciecz- ciecz (DLLME), mikroekstrakcję dyspersyjną wspomaganą ultradźwiękami (UA-DLLME), mikroekstrakcję dyspersyjną z procesem zestalania pływającej kropli rozpuszczalnika (DLLME-SFO) oraz mikroekstrakcję z emulgacją wspomaganą ultradźwiękami (USAEME) – do wydzielania  $\beta$ -sitosterolu.

### **Wyniki, interpretacja, efekty, nowości**

Przeprowadzone obszerne badania eksperymentalne doprowadziły do uzyskania bardzo interesujących i ważnych z naukowego i praktycznego punktu widzenia wyników, z kilku powodów.

1. Eksperymentalnie wykazano przydatność ekstrakcji micelarnej (ME) i ekstrakcji do punktu zmętnienia (CPE), do wydzielania statyn z roztworów, uzyskując w warunkach zoptymalizowanych współczynniki wzbogacenia analitu w zakresie 4-9 (ME: lowastatyna-LOV, fluwastatyna-FLU) oraz 11-12 (CPE: rosuwastatyna-ROS, atorwastatyna-ATOR). Wyznaczone warunki ekstrakcji statyn w skali mikro badano w połączeniu z chromatograficznymi i spektrofotometrycznymi (HPLC-UV) metodami ich oznaczania uzyskując szerokie zakresy liniowości metod. Wykazano jednocześnie, że granice wykrywalności (LOD) i granice oznaczalności (LOQ) badanych statyn mieszczą się w zakresie od 0,14 do 2,69  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , z preferencją dla ekstrakcji micelarnej w układach z mono- lub mieszaninami związków powierzchniowo czynnych. Wykazano jednocześnie, że z pośród szeregu jonów ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ) oraz wybranych leków najmniejszy wpływ na chromatograficzne oznaczanie statyn (HPLC-UV) po ich ekstrakcji micelarnej (ME) oraz ekstrakcji do punktu zmętnienia (CPE) wykazują jony amonowe, boranowe i magnezu podczas gdy jony glinu i żelaza(III) mogą przeszkadzać (oczyszczenie próbki skutecznie eliminuje wpływ wskazanych jonów). Opracowano procedury analizy statyn i zweryfikowano ich zastosowania w praktyce poprzez badania obecności LOV, FLU, ROS i ATOR (lowastatyna, fluwastatyna, atorwastatyna, rosuwastatyna) w wodach powierzchniowych i ściekach z 5 rzek o różnym stopniu zanieczyszczenia (Horodnianka, Narew, Bug, Wisła, Odra) oraz ściekach surowych i oczyszczonych z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Białymstoku. Wykazano, że opracowane chromatograficzne procedury oznaczania tych związków po ich wcześniejszej ekstrakcji techniką ekstrakcji micelarnej mogą być stosowane w praktyce do rutynowych badań statyn w próbkach środowiskowych, głównie wodach powierzchniowych i ściekach.

2. Wykazanie, że mikroekstrakcja z wykorzystaniem wirującego elementu sorpcyjnego (SBSE) jest odpowiednią techniką do grupowego wydzielania atorwastatyny (ATOR), fluwastatyny (FLU) i lowastatyny (LOV) z roztworów. Opracowana procedura ekstrakcyjna pozwala na uzyskanie wysokich wartości współczynników wzbogacenia (EF 31-38) badanych analitów. Efekt ten uzyskano dzięki miniaturyzacji objętości ekstrahenta na etapie desorpcji analitów ze złoża, którym był polidimetylosiloksan. Jest to oczywista niekwestionowana zaleta opracowanej przez Autorkę procedury ekstrakcyjnej SBSE (ekstrakcja z wirującym elementem sorpcyjnym) w porównaniu do ekstrakcji micelarnej (ME) i ekstrakcji do punktu zmętnienia (CPE).

Opracowaną procedurę analityczną jako ekstrakcję z wirującym elementem sorpcyjnym w połączeniu z chromatografią cieczą sprężoną z tandemową spektrometrią mas (SBSE-LC-MS/MS) zastosowano do oznaczenia atorwastatyny, fluwastatyny i

lowastatyny w ściekach surowych i oczyszczonych z Miejskiej Oczyszczalni Ścieków w Białymstoku. Wykazano, że opracowana metoda (SBSE-LC-MS/MS) analizy statyn pozwala na większą czułość i specyficzność oznaczeń w stosunku do innych metod.

3. Zastosowanie nowego złoża sorpcyjnego (polimeryczne złożo styren/diwinylobenzen, SDB1) prowadzące do selektywnego wydzielenia  $\beta$ -sitosterolu z roztworów metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE), ze współczynnikiem wzbogacenia analitu 10,5. Połączenie badanej techniki ekstrakcyjnej z metodą spektrofotometryczną oznaczania analitu skutkuje charakterystycznym szerokim zakresem linowości ( $1,04\text{--}33,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), z granicami wykrywalności i oznaczalności wynoszącymi odpowiednio  $0,411 \mu\text{g mL}^{-1}$  (LOQ), i  $1,37 \mu\text{g mL}^{-1}$  (LOD). Zweryfikowano z wynikiem pozytywnym poprawność opracowanej procedury poprzez analizę ilościową  $\beta$ -sitosterolu w suplementach diety (pięć preparatów). Opracowaną procedurę zastosowano do analizy  $\beta$ -sitosterolu w stałych produktach spożywczych (12 produktów: migdały, orzechy włoskie, laskowe, ziemne, pistacjowe, płatki pszeniczne i owsiane, otręby pszenne i żytnie, pestki słonecznika, nasiona sezamu i jagody goji), olejach roślinnych (olej rzepakowy, słonecznikowy, kukurydziany i sojowy) i oliwie z oliwek. Poprzez weryfikację wyników analitycznych z zastosowaniem niezależnej metody (wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją w nadfiolecie, HPLC-UV), po ekstrakcji analitu do fazy stałej na złożu krzemionkowym, wykazano dobrą zgodność wyników i poprawność opracowanej procedury.

4. Rozwiązanie przez Autorkę niezmiernie trudnych problemów związanych z wydzieleniem i zagęszczaniem  $\beta$ -sitosterolu podczas jego analizy w owocach i warzywach (zawartość analitu kilkukrotnie niższa niż w produktach zbożowych i kilkadziesiąt razy niższa w odniesieniu do olejów roślinnych). Trudności analityczne, które pojawiły się na tym etapie badań (zastosowanie do wydzielenia analitu opracowanej wcześniej techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE) nie przynosi oczekiwanych rezultatów - niskie współczynniki wzbogacania, mała czułość oznaczeń) powodują, że Autorka wprowadza i bada nowe techniki mikroekstrakcyjne oparte na układach dyspersyjnych. Wyniki badań prowadzą do opracowania nowych procedur ekstrakcyjnego wydzielenia  $\beta$ -sitosterolu technikami mikroekstrakcji dyspersyjnej ciecz–ciecz (DLLME) bez udziału oraz z udziałem ultradźwięków (metoda UA-DLLME). Na podkreślenie zasługuje zastosowanie do wydzielenia  $\beta$ -sitosterolu z roztworów wodnych nowej techniki mikroekstrakcji z wykorzystaniem zestalania pływającej kropli rozpuszczalnika (DLLME-SFO). Jest to oryginalny i specyficzny układ ekstrakcyjny bazujący na zmianie stanu skupienia ekstrahenta w układzie. W tym przypadku zastosowano 1-dodekanol przeprowadzając jednocześnie optymalizację parametrów wpływających na wydajność ekstrakcji. Należy podkreślić z uznaniem, że zastosowanie techniki mikroekstrakcji dyspersyjnej i jej modyfikacji skutkowało uzyskaniem bardzo wysokich współczynników wzbogacania (EF)  $\beta$ -sitosterolu: od 59 (mikroekstrakcja dyspersyjna ciecz–ciecz, DLLME), poprzez 66 (mikroekstrakcja dyspersyjna ciecz–ciecz wspomaganą ultradźwiękami, UA-DLLME), do 84 (ekstrakcja z wykorzystaniem zestalania pływającej kropli rozpuszczalnika, DLLME-SFO). Opracowane procedury chromatograficznego oznaczania  $\beta$ -sitosterolu po jego wydzieleniu i zateżeniu metodami mikroekstrakcji dyspersyjnej charakteryzują się wysokimi wartościami odzysku w zakresie od 99% do 106%. Cukry, jony sodu, magnezu, aniony chlorkowe i azotanowe(V) mogą występować w ponad kilkunastokrotnym nadmiarze w stosunku do oznaczanego

fitosterolu i nie wpływają na wynik analizy, podczas gdy witaminy: E, B6 i B12 przeszkadzają w chromatograficznym oznaczaniu  $\beta$ -sitosterolu w produktach spożywczych. Wykazano, że opracowane procedury analityczne oparte na mikroekstrakcji dyspersyjnej analitu (DLLME, UA-DLLME, DLLME-SFO) stosować można do ilościowego oznaczenia  $\beta$ -sitosterolu w sokach owocowych.

5. Uzyskanie nadzwyczaj wysokiego współczynnika wzbogacania  $\beta$ -sitosterolu ( $EF = 97$ ) poprzez zastosowanie do wydzielania i zagęszczania analitu nowej techniki ekstrakcyjnej, tj. mikroekstrakcji poprzez emulgację wspomaganą ultradźwiękami (USAEME). Wskazano odmienny sposób przygotowania próbek produktu w stosunku do poprzednio stosowanych technik ekstrakcyjnych. W tym przypadku wymagana jest wstępna homogenizacja produktu i ekstrakcja cieczowa  $\beta$ -sitosterolu, a następnie ekstrakcja poprzez emulgację wspomaganą ultradźwiękami (USAEME). Niewątpliwą zaletą opracowanej metody jest bardzo wysoki współczynnik wzbogacania  $\beta$ -sitosterolu ( $EF = 97$ ), najwyższy spośród wszystkich badanych w pracy metod ekstrakcyjnych, przy jednocześnie wysokim odzysku analitu (99,8%). Opracowaną procedurę testowano i zastosowano do ilościowego oznaczania  $\beta$ -sitosterolu w warzywach (4) i owocach (4) uzyskując odzysk analitu w próbkach rzeczywistych w zakresie 87% - 104%. Wyniki badań wskazują na praktyczne zastosowanie opracowanych metod do analizy  $\beta$ -sitosterolu w owocach i warzywach oraz suplementach diety.

Uwagi merytoryczne i ogólne dotyczące poruszanych problemów zestawiono poniżej.

1. Z analizy danych eksperymentalnych można wnioskować o współzależności zmian współczynnika wzbogacania ( $EF$ ) i odzysku analitu dla statyn w badanych układach. Podczas gdy współczynnik wzbogacania ( $EF$ ) statyn wzrasta od ok. 4-7 dla ME (ekstrakcja micelarna), poprzez ok. 12 (ekstrakcja do punktu zmętnienia, CPE) do ok. 31-38 (ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego, SBSE), w tym samym czasie odzysk statyn w procedurze analitycznej maleje w odwrotnym kierunku, od wartości ok. 95-97% (ME), poprzez 94-96% (CPE) do ok. 49-61% (SBSE). Czy jest to zależność pozorna?

2. SBSE to ekstrakcja z wykorzystaniem ruchomego elementu sorpcyjnego. Niezbędnym warunkiem uzyskania wysokiej wydajności ekstrakcji jest ilościowa sorpcja związków na warstwie PDMS (polidimetylosiloksan) po odpowiedniej aktywacji złoza, oraz po zakończeniu sorpcji – desorpcja statyn z medium ekstrakcyjnego. Wyselekcjonowane eksperymentalnie rozpuszczalniki pozwalają uzyskać wydajności ekstrakcji które są dalekie są od wartości teoretycznych (np. dla lowastatyny-LOV odpowiednio 49,2% i 95,2%, tab. 45). Co może być źródłem występujących rozbieżności?

3. Parametrami charakterystycznymi dla układów ekstrakcyjnych nierównowagowych, a takie dominują w przeprowadzonych badaniach, są m.in. współczynnik podziału i stopień wydzielania substancji (procent ekstrakcji), tymczasem w opisie wyników stosowano współczynnik wzbogacania analitu. Czy wartość np.  $EF = 65,9$  (współczynnik wzbogacania  $\beta$ -sitosterolu w procedurze z mikroekstrakcją dyspersyjną wspomaganą ultradźwiękami, UA-DLLME) oznacza co najmniej 66,5% wydzielanie analitu z roztworu wyjściowego?

4. W pracy występują nieliczne błędy edytorskie i lapsusy językowe, np. „test T-Studenta” zamiast test t-Studenta (s. 194), niektóre zdania nie są zamknięte kropką czy pytajnikiem, pominięto współczynnik proporcjonalności w równ. (1) dla metody SBSE, czy zastosowanie nietypowych symboli do znanych wielkości (np. symbol  $m$  do oznaczenia stężenia, s. 41).

## Podsumowanie

Recenzowana praca dotyczy bardzo ważnego i nierozwiązanego do tej pory problemu izolacji (wydzielania) i zagęszczania wybranych statyn oraz fitosteroli, na poziomie śladów i mikrośladów z materiału o bogatej matrycy przed ich analitycznym oznaczeniem. Szczególnie cenne wyniki uzyskano w zakresie zastosowania nowych technik ekstrakcyjnych w tym celu. Praca dostarcza nowych, nieznanych do tej pory danych na temat izolacji i wzbogacania lowastatyny, fluwastatyny, atorwastatyny i rosuwastatyny oraz  $\beta$ -sitosterolu technikami mikroekstrakcyjnymi opartymi o różne mechanizmy i rozwiązania techniczne, a fakt ten stanowi znaczący i ważny element nowości naukowej. Opracowano jednocześnie jedenaście procedur analizy badanych związków. Opracowane procedury wykazują charakter aplikacyjny i mogą być stosowane do rutynowych badań i analizy statyn w próbkach środowiskowych oraz  $\beta$ -sitosterolu w produktach żywnościowych i suplementach diety. Wskazane wcześniej uwagi nie mają wpływu na wysoką wartość merytoryczną przedłożonej pracy, osiągnięte wyniki naukowe i znaczenie aplikacyjne.

**Reasumując stwierdzam**, że rozprawa doktorska Pani Marty Hryniewickiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego z zakresu izolacji (wydzielania) i zagęszczania statyn i  $\beta$ -sitosterolu z użyciem nowych technik ekstrakcyjnych, jest przykładem rozprawy doktorskiej opartej na szerokich i dobrze wykonanych badaniach wymagających umiejętności samodzielnego ich prowadzenia, zawiera wiarygodne i właściwie zinterpretowane wyniki naukowe. Recenzowana praca w pełni spełnia ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim i wnioskuję o dopuszczenie jej Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Uwzględniając jednocześnie część naukową i aplikacyjną zrealizowanej pracy oraz fakt znaczącego opublikowania wyników w postaci 8. artykułów naukowych, 4. rozdziałów w monografiach i ich prezentacji na 14. konferencjach wnoszę o wyróżnienie pracy doktorskiej.



Prof. dr hab. inż. Jan Kalembkiewicz