



prof. dr hab. Michał Dadlez
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
ul. Pawińskiego 5A
02-106 Warszawa
tel. 0-22 5923470-75
e-mail: michald@ibb.waw.pl

Warszawa, 12.01.2016

Recenzja pracy doktorskiej p. mgr Anny Troć pt. „Badania struktury wybranych grup związków organicznych i ich kompleksów z wykorzystaniem techniki pomiaru mobilności jonów sprzężonej ze spektrometrią mas.”

W swojej pracy doktorantka zajęła się oceną możliwości zastosowania techniki separacji zależnej od mobilności jonów sprzężonej ze spektrometrią mas (IM-MS) do uzyskiwania rozdziału różnych związków izomerycznych dla celów analitycznych a także uzyskiwania więzów eksperymentalnych opisujących własności strukturalne badanych związków. Mobilność jonów w eksperymencie IMS-MS zależy od przekroju czynnego cząsteczek w fazie gazowej. Sprzężenie techniki IMS ze spektrometrią mas pozwala zatem na odróżnianie sygnałów od izobarycznych analitów charakteryzujących się odmiennym przekrojem czynnym i jeśli to konieczne obliczanie wartości przekrojów czynnych badanych cząsteczek a także ich niekowalencyjnie stabilizowanych kompleksów. Daje to nowego typu więzy eksperymentalne opisujące struktury cząsteczek lub ich asocjatów i umożliwiające selekcję modeli molekularnych najlepiej tłumaczących uzyskane dane eksperymentalne. Możliwość rutynowego prowadzenia eksperymentu IM-MS z wykorzystaniem komercyjnie dostępnych spektrometrów mas jest relatywnie nowa, dlatego też podjęcie projektu testowania podstawowych własności analitycznych tej metody dla wybranej grupy różnorodnych związków jest jak najbardziej uzasadnione. Przedstawiony doktorat stanowi taką właśnie próbę. Dla wybranej grupy związków odpowiada na pytania o osiągalną rozdzielczość metody tj. o mierzalne różnice w wartościach przekroju czynnego i granice czułościowe metody. Testuje także szereg metod poprawiania rozdzielczości pomiaru przez kompleksowanie badanych cząsteczek np. z jonami metali lub związkami chiralnymi. Istotną częścią pracy jest część obliczeniowa, w której metody dynamiki molekularnej zastosowano do obliczeń teoretycznych wartości przekroju czynnego alternatywnych modeli molekularnych badanych struktur i ich konfrontacja z wynikiem eksperymentu.

W pracy wydzielono część wstępną zawierającą wprowadzenie literaturowe łączące prezentację samej metody badawczej jak i dotychczas uzyskiwanych przez inne zespoły



rezultatów. Sformułowano też cel pracy jako „pogłębienie wiedzy w zakresie wykorzystania techniki IMS-MS do rozdziału i badania struktur wybranych grup związków organicznych”. Prezentację rezultatów podzielono na 5 części odpowiadających pięciu grupom badanych związków i opatrzono wspólnym opisem technik eksperymentalnych i obliczeniowych, zamieszczonym w końcowej części rozprawy. Praca zawiera też obszerny wykaz literatury przedmiotu. W pracy nie wydzielono odrębnej części dyskusji, jej elementy zostały z rzadka wkomponowane w tok prezentacji rezultatów. Czy to odstępstwo od klasycznego podziału tekstów rozpraw doktorskich wynika z przeświadczenia o braku materiału do dyskusji w literaturze, przekonania że prezentacja wybranych zastosowań IMS-MS w części wstępnej powinna wystarczyć do oceny rezultatów uzyskanych przez Autorkę w świetle dokonań innych zespołów, czy też wynika z innych przyczyn?

Część literaturową rozpoczyna rys historyczny dotyczący powstania metody IMS i wprowadzający podstawy teoretyczne prowadzonych dalej rozważań. Autorka umiejętnie wyważyła konieczność zamknięcia tekstu w niewielkiej objętości i przedstawienia założeń nieznaną jeszcze powszechnie metody tak by dalsze części pracy były zrozumiałe dla niespecjalistów. Podobnie sprawnie napisany jest rozdział charakteryzujący znane z literatury zastosowania metody IMS do badania związków organicznych, w którym dobrano przykłady literaturowe tak, by korespondowały z własnymi działaniami. Choć jest to objętościowo nieproporcjonalnie obszerna część, daje dobry przegląd wszystkich parametrów pomiaru i podejść, które mogą być optymalizowane w celu uzyskania pożądanych rozdziałów niskocząsteczkowych związków organicznych. Natomiast bardzo intensywnie rozwijający się dział zastosowań IMS-MS do badań struktur kompleksów niekowalencyjnych (zwłaszcza o znaczeniu biologicznym), został potraktowany bardzo skrótowo, z obszernej literatury przedmiotu wybrano trzy pozycje, należało choćby zaznaczyć istnienie innych poprzez odnotowanie kilku prac przeglądowych w tej dziedzinie.

W części badawczej wydzielono pięć grup badanych związków i dla każdej z nich opracowano odrębną metodykę analiz IMS-MS, pozwalającą w każdym przypadku na uzyskanie efektywnego rozdziału form izomerycznych lub selekcję najbardziej prawdopodobnych modeli struktur badanych kompleksów, spełniając tym samym założone cele pracy. Uzyskane wyniki zostały już częściowo opublikowane. Prezentacja rezultatów przebiega w każdej z pięciu grup zasadniczo według wspólnego schematu: uzyskanie krzywej kalibracyjnej, odrębnej dla danej grupy, optymalizacja warunków IMS-MS i pomiary przekrojów czynnych, obliczenia teoretyczne i konfrontacja obliczonych wartości przekroju czynnego z eksperymentalnymi. W każdym jednak przypadku procedury zostają rozszerzane i dopasowane do specyfiki badanych związków i celu eksperymentu, co pozwala na przełamanie pojawiających się trudności i uzyskanie pożądanego rezultatu.

W dwu pierwszych częściach pracy przedmiotem badań są związki flawonoidowe, trudne w analizie ze względu na powszechnie występująca izomerię. Stąd potrzeba szukania nowych



metod analitycznych dla tej grupy związków. W części pierwszej obiektem badań są cztery stereoizomery katechin, ze względu na małe różnice w wartościach przekroju czynnego trudne w rozdziale nawet z zastosowaniem techniki IMS. Aby uzyskać rozdział Autorka modyfikuje procedury, testując np. wpływ rodzaju gazu buforowego, oddziaływań z kationami metali i kompleksów z innymi związkami, uzyskując pożądany rozdział diastereoizomerycznych katechin dopiero po skompleksowaniu ich z jonami miedzi i jednocześnie z enancjomerycznie czystymi formami D-, bądź L-aminokwasów. W drugiej części wybrała sześć związków flawonoidowych reprezentujących zestaw izomerów konstytucyjnych, znowu w przypadku niedostatecznego rozdzielania opracowując metodę kompleksowania z kationami potasu.

W przypadku sześciu związków β -laktamowych (część trzecia) Autorka wykonała złożony eksperyment optymalizacyjny obejmujący jeszcze inne parametry pomiarowe, takie jak temperatura źródła i desolvatacji oraz amplituda i szybkość fali w komorze typu „wędrującej fali”. Pomogło to uzyskać poprawę rozdzielczości i zbudowanie modeli struktur tych związków dobrze korelujących z wynikami eksperymentu IMS.

Ostatnie dwie części poświęcone są analizie strukturalnej kompleksów niekowalencyjnych kwasu foliowego z cyklodekstrynami i dimerów kaliksalenów, łączącej pomiary IMS-MS z dokowaniem molekularnym i obliczeniami stabilności termodynamicznej różnych struktur modelowych. Autorka wykazała przydatność metod IMS MS dla uzyskiwania więzów eksperymentalnych pozwalających na selekcję najbardziej prawdopodobnych struktur, pod warunkiem istnienia znamiennych różnic w wartościach przekroju czynnego między tymi strukturami. Ponieważ w przypadku kompleksu z γ -cyklodekstryną takich różnic nie zaobserwowano Autorka oparła selekcję spośród dwu modeli na obliczeniach stabilności, stwierdzając w konkluzji że jedna ze struktur „okazała się bardziej stabilna” – str. 114. Bardziej adekwatne wydawałoby się stwierdzenie, że obliczenia stabilności sugerują wybór jednego z modeli jako bardziej prawdopodobnego. Skoro Autorka uznaje procedury obliczeniowe za doskonałe i ich wyniki za pewne, to rodzi się prowokacyjne pytanie czy eksperymenty są nadal niezbędne?

W przypadku kaliksalenów użyto enolazy wraz z jej wieloma stopniami naładowania jako związku kalibracyjnego odchodząc, być może z konieczności, od zasady podobieństwa charakteru chemicznego kalibranta i cząsteczki mierzonej. Dodatkowo spowodowało to konieczność użycia potęgowej postaci zależności kalibracyjnej (równanie 12), zamiast dotychczas w pracy używanej liniowej (równanie 11) warto byłoby przy tej okazji przedyskutować obszary stosowalności jednej i drugiej formuły i konsekwencje stosowania różnych typów związków kalibracyjnych.

Odkładając na bok powyższe pytania, zrodzone raczej z ciekawości i chęci pobudzenia dyskusji, można stwierdzić że Autorka wykazała przydatność metod IMS-MS zarówno w procedurach analitycznych badanych związków jak i w analizie ich własności strukturalnych, wypełniając tym samym cele jakie sobie postawiła w toku pracy doktorskiej, a jej wkład w powstałe publikacje jest niewątpliwie kluczowy. Pani mgr Anna Troć uzyskała rezultaty o istotnej



wartości, które przyczynią się do popularyzacji metodyki IMS-MS i niewątpliwie będą rozwijane w przyszłości. W przedstawionej rozprawie Autorka bardzo sprawnie i jasno opisała uzyskane rezultaty, a praca pod względem formalnym jest w zasadzie bez zarzutu. Poniżej zamieszczone drobne uwagi też nie wpływają na bardzo dobrą ocenę całości pracy, pozwalając wnioskować o dopuszczenie p. mgr Anny Troć do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Drobne uwagi:

Pojawianie się asymetrycznych rozkładów (Rys. 1.3b), w kontraście do spodziewanych symetrycznych (Rys. 1.4c) dobrze byłoby opatrzyć jakimś komentarzem. Podobnie zanik dimerycznego sygnału kemferolu w mieszaninie z luteoliną

Na str. 66 w ostatnim zdaniu powinno być „D-leucyna oraz L-prolina” zamiast „D-alanina oraz L-prolina”.

Na str. 84 w ostatnim zdaniu powinno być Tabele 5.23, 24, 25, a nie jak w tekście.

Autorka używa sformułowań „widma masowe” i „elektrosprej”, lepiej byłoby „widma mas” i „elektrorozpylanie”

W podsumowaniu na str. 86 pojawia się genisteina zamiast dajdzeiny

Str. 100 Tabela 3.4 [M+H]⁺ kolejność wartości Ω dla trzech pierwszych związków zmienia się (dla poliala związek 2 ma największą Ω a dla lekopodobnych związków 3), w zależności od tego który z dwu kalibrantów został użyty. Czy kolejność wartości może zależeć od przyjętego kalibranta?

Str. 116 Schemat 5.22 - skąd ta numeracja? I podobnie str.120 schemat 1c – powinno by 5.22?

Str. 121 Rysunek 5.3 powinno by 5.4

Str. 129 wzór na t_{dcorr} powinien zawierać wartość t_d a nie t_d' ? Warto też podać źródło tak przyjętej zależności

prof. dr hab. Michał Dadlez