

Dr hab. Szymon Bocian, prof. UMK  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Chemii  
Katedra Chemii Środowiska i Bioanalityki  
ul. Gagarina 7, 87-100 Toruń

Toruń 28 maja 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej  
Pani mgr Wiktorii Frankiewicz

*Zatytułowanej „Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych za pomocą HPLC/DAD”*

Rozwój cywilizacyjny oczekuje od chemików analityków coraz czulszych i dokładniejszych metod oznaczania różnego rodzaju związków chemicznych wprowadzanych do środowiska naturalnego. Substancjami tymi są zarówno związki organiczne, jak również nieorganiczne. Wśród nich ważne miejsce zajmuje siarkowodor i jony jego soli (siarczki i wodorosiarczki). Ze względu na toksyczne właściwości siarkowodoru, jego stężenie, jak i stężenie jonów siarczkowych jest badane w różnych matrycach środowiskowych i biologicznych.

Najprawdopodobniej z tego powodu celem pracy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Frankiewicz było opracowanie nowych metod analitycznych, opartych o wykorzystanie techniki HPLC-UV-Vis, które umożliwią analizę materiału biologicznego na zawartość jonów siarczkowych. Tak postawiony cel badań należy uznać za w pełni zasadny zarówno ze względów poznawczych jak i potencjalnych zastosowań praktycznych.

Przesłana mi do recenzji rozprawa doktorska realizowana była pod bezpośrednim kierunkiem dr hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ, w Katedrze Chemii Środowiska Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego.

Rozprawa składa się z wprowadzenia, przedstawienia celu pracy, części teoretycznej omawiającej zastosowanie soli piryliowych oraz właściwości i metod oznaczania jonów siarczkowych, opisu przeprowadzonych badań wraz z obszernym opisem procedur,

charakterystyki opracowanych metod, podsumowania, wniosków, wykazu literatury, streszczenia i wykazu skrótów.

W części teoretycznej autorka przedstawiła właściwości soli piryliowych i ich reaktywność, która pozwala na ich zastosowanie jako odczynnika derywatyzującego w metodach oznaczania jonów siarczkowych. Związki te w wyniku reakcji z jonami siarczkowymi tworzą bowiem barwne pochodne, umożliwiające detekcję spektrofotometryczną. W dalszej części przedstawione zostały właściwości i zastosowanie jonów siarczkowych. Znacząca część tego opisu dotyczy procesów metabolicznych w organizmach żywych, których produktem lub substratem jest siarkowodór. W tym miejscu warto podkreślić, że oprócz powszechnie znanego toksycznego działania siarkowodoru na organizmy żywe, endogeny siarkowodór jest ważny dla prawidłowego działania komórek, tkanek i narządów.

W obu tych przypadkach działania toksycznego i prozdrowotnego ważne jest monitorowanie stężenia siarkowodoru zarówno w powietrzu, wodzie jak i tkankach i płynach fizjologicznych. Z tego powodu Autorka przeprowadziła studia literaturowe dokonując krytycznego przeglądu obecnie stosowanych metod, przedstawiając ich możliwości, zalety i wady. Wiele metod normatywnych oznaczania siarkowodoru i siarczków stosuje niezbyt nowoczesne techniki, jak np. miareczkowanie jodometryczne, elektrody jonoselektywne itd. Część teoretyczna bazuje na 125 pozycjach literaturowych.

Na podstawie przeprowadzonych studiów Pani Magister Frankiewicz najprawdopodobniej stwierdziła, że oznaczanie jonów siarczkowych można by wykonać, wykorzystując technikę chromatografii cieczowej, co uważam za bardzo dobre rozwiązanie. Istnieje jednak jeden problem, mianowicie detekcja jonów siarczkowych w układzie chromatograficznym. Problem ten został skutecznie rozwiązany przez deprzywatyzację za pomocą soli piryliowych.

W części eksperymentalnej Pani Magister Wiktoria Frankiewicz zamieściła zestawienie sprzętu laboratoryjnego i opis chromatografu cieczowego. Do tej części mam kilka uwag, które zamieszczę w dalszej części recenzji. Na dalszych stronach znajduje się lista używanych w badaniach odczynników chemicznych, a następnie opisy procedur eksperymentalnych syntezy odczynników derywatyzujących, przygotowywania roztworów,



itd. Moim zdaniem w tej części opisy są nieco przesadne. Zajmują one dużo miejsca, a w praktyce niewiele wnoszą do rozprawy doktorskiej.

W dalszej części Autorka opisuje procedury analityczne, które stanowią zasadniczy opis eksperymentalny badań będących podstawą rozprawy doktorskiej. Opisy te są bardzo szczegółowe i nie pozostawiają wątpliwości co do szczegółów przeprowadzonych badań.

Kolejną część rozprawy stanowi przedstawienie i dyskusja otrzymanych wyników. Autorka przedstawia optymalizację warunków chromatograficznych, w tym dobór długości fali dla wybranych odczynników derywatyzujących, pH fazy ruchomej, skład procentowy fazy ruchomej itd. Jest to prawidłowy proces opracowywania metody analitycznej z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Poza opracowaniem metody analitycznej, dla oznaczania jonów siarczkowych kluczowa jest procedura ich derywatywacji. Proces ten również został skrupulatnie przeprowadzony i opisany. Czytając rozprawę widać systematyczne opracowywanie metody przez badanie wpływu poszczególnych warunków, takich jak pH, zawartość buforu, zawartość kwasu, rodzaj kwasu i stosunek molowy reagentów. W efekcie Autorka otrzymuje dwie bardzo wydajne metody derywatywacji za pomocą dwóch odczynników derywatyzujących. W kolejnym etapie Autorka przeprowadziła walidację metod, wyznaczając granice wykrywalności i oznaczalności, zakres liniowości, współczynnik determinacji (który został przez Autorkę nieprawidłowo nazwany współczynnikiem korelacji) oraz powtarzalność metody.

Metody analityczne opracowane na roztworach wzorcowych zostały następnie zaadoptowane do matryc biologicznych. Pierwszą z matryc był ludzki mocz, a drugą, wątroba kurza. Obecność matrycy w próbkach wymusiła optymalizację procesu derywatywacji jak i przeprowadzenia walidacji metody.

Finalnie Pani magister Frankiewicz wykorzystwała opracowane metody do analizy moczu ludzkiego 20 ochotników. W próbkach tych oznaczona została również kreatynina. O ile ludzki mocz jest całkiem skomplikowaną matrycą dla chromatografisty, wątroba kurza jest zdecydowanie bardziej uciążliwa do badań a przygotowanie próbki nieporównywalnie trudniejsze. Niemniej jednak Autorka podjęła trud optymalizacji procesu

homogenizacji i przygotowania próbki, optymalizacji procesu derywatywacji i walidacji metody. Procedury te zostały systematycznie opisane na kolejnych stronach rozprawy.

Obie metody, z wykorzystaniem odczynnika L1 i LN1 dawały bardzo zbliżone wyniki, niemniej jednak zastosowanie odczynnika LN1 dawało niższe granice oznaczalności. Mimo tego, że różnica w LOQ była niewielka, zarówno dla ludzkiego moczu jak i dla wątroby kurzej zastosowanie odczynnika LN1 umożliwiło oznaczenie jonów siarczkowych w większej ilości próbek. W wyniku porównania metod za pomocą statystyki opisowej Autorka udowodniła, że różnice wyników otrzymywanych tymi metodami nie są statystycznie istotne.

#### *Uwagi szczegółowe*

Pani mgr Wiktora Frankiewicz postawiła za cel swojego doktoratu opracowanie nowych metod chromatograficznych umożliwiających oznaczanie jonów siarczkowych w matrycach biologicznych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Bez wątplenia cel ten został osiągnięty. Opracowane metody są czułe, powtarzalne, a również stosunkowo proste i tanie. Takie przynajmniej odnoszę wrażenie, czytając rozprawę, o ile metodę derywatywacji można nazwać prostą. Fakt, że metody są proste i tanie daje im szansę na to, że mogą znaleźć zastosowanie w badaniach rutynowych. Jeżeli można je zastosować do skomplikowanych matryc, tym łatwiej będzie je zaadoptować do prostszych matryc, takich jak na przykład woda.

Obowiązkiem recenzenta, poza wskazaniem osiągnięć przedstawionych w rozprawie doktorskiej jest również wskazanie znalezionych tam błędów. Ma to generalnie na celu uniknięcie podobnych błędów przez młodego badacza w przyszłości.

Lista moich uwag i pytań jest niestety dość długa:

- Rysunek 3 przedstawia numerację cyframi arabskim, a diskutowane są pozycje  $\alpha$  i  $\gamma$ .
- Opis chromatografu cieczowego jest generalnie nieprawidłowy: o pompie: „...charakteryzowała się rozszerzonym zakresem mocy i umożliwiała dostarczanie ciśnienia w zakresie 400 bar. Pompa zapewniała bezimpulsowy, stabilny przepływ i dobre wymieszanie rozpuszczalników. Dwa pływające tłoki.... Poproszę





doktorantkę o komentarz na temat pracy pompy do HPLC. Problematyczny jest również opis dozownika, sugerujący, że jest tam kolumna i przedstawiona charakterystyka użytej kolumny.

- Opisana procedura otrzymywania kwasu solnego o  $c=0,5 \text{ mol/dm}^3$  na pewno prowadzi do znacznie wyższego stężenia, str. 42;
- Jednostka „rpm” zawiera w sobie minutę, więc zapis „rpm/minutę” jest niepoprawny, str. 43;
- Chciałbym dowiedzieć się, w jaki sposób doktorantka przygotowywała roztwory buforowe;
- Z czego wynika fakt dopuszczalnego ciśnienia  $<138 \text{ bar}$ ?, str. 56;
- Na jakiej podstawie wyznaczono szybkości przepływu, odpowiednio 0,9 i 0,55 ml/min?, str. 56;
- Wykres 10 (i seria podobnych: 11, 18, 19, 33, 34) pokazuje jedynie powtarzalność dozowania. Łączenie tych punktów jest nielogiczne, a dobór zakresu osi y zaciera rozumienie przedstawionych danych. Generalnie te wykresy nie wnoszą nic do rozprawy;
- Tabela 15 i kolejne: co oznacza „-”? Generalnie należy wskazać n.d., n.w. lub  $<LOD$  jeśli nie wykryto, lub  $<LOQ$  jeżeli wykryto, ale nie można oznaczyć;
- Wykres 24 i 25 oraz 39 i 40: co miało na celu narysowanie chromatogramu punktami zamiast linią ciągłą?;
- Wykres 28: czy spadek nie jest wynikiem rozcieńczenia? Dlaczego nie sprawdzono objętości mniejszej niż 5 ml?;
- Wnioski: dlaczego czas analizy nie może przekroczyć 10 minut?;

Mam też pewne zastrzeżenia co do stosowanego słownictwa i składni:

- Chromatografia „nadkrytyczna” to zbyt duży skrót myślowy, str. 7;
- Oznaczenie jest zawsze ilościowe, str. 8;
- W wielu zdaniach zastosowano niepoprawną składnię, brzmią jak tłumaczenie tekstu przez aplikację tłumaczącą;

- Niektóre zwroty, jak np. „doświadczenia na myszach donoszą...” brzmią bardzo nienaukowo i są niepoprawne, str. 18, „procedura błękitu metylenowego”, str. 29, „przyczepność do różnych materiałów”, str. 34, to adhezja lub adsorpcja;
- Niektóre zdania nie powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej: „Pozytywne funkcje tego związku chemicznego są przeciwieństwem w stosunku do jego negatywnych funkcji”, str. 23 oraz „Zatrucie cyjankiem generuje podobne zjawiska”, str. 24;
- Dlaczego stosowany jest zapis „analiza instrumentalna” zamiast „analiza chromatograficzna”?
- „ependorfy” i „falkony” oficjalnie nie występują w języku polskim;
- Zamiast słowa „standardy” w polskich pracach naukowych używa się słowa „wzorce”;
- Dlaczego stężenie kwasu wpisywane jest w nazwę, np. „kwas 36% solny”?
- 3000 µl to 3 ml, generalnie unikamy zbędnych zer;
- Kalibrację prowadzi się o krzywe wzorcowe, które zazwyczaj są proste. Termin „prosta wzorcowa” stosowany w rozprawie jest nieprawidłowy.

Podsumowując, uważam, że pomimo wskazanych niedociągnięć recenzowana rozprawa doktorska dotyczy ważnego, z poznawczego i praktycznego punktu widzenia, poszukiwania nowych metod analitycznych. Opracowane metodyki analityczne spełniają w pełni kryteria akceptacji odnośnie: zakresu pomiarowego, liniowości, granicy wykrywalności i oznaczalności, dokładności, precyzji, odzysku oraz odporności. Krytycznie podejście Doktorantki do uzyskanych wyników świadczy o dojrzałości naukowej i doskonałej znajomości zagadnień diskutowanych w pracy.

### *Wniosek końcowy*

Rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Frankiewicz jest oryginalnym opracowaniem naukowym. Uzyskane wyniki badań wzbogacają wiedzę z zakresu chemii analitycznej i chemii środowiska. Doktorantka wykazała się zdolnością prowadzenia wnikliwych studiów literaturowych, umiejętnością planowania i wykonywania eksperymentów, interpretowania otrzymanych wyników badań, krytycznej oceny faktów oraz formułowania wniosków. W



moim przekonaniu Doktorantka jest dojrzałym naukowcem przygotowanym do samodzielnego prowadzenia badań.

Reasumując, stwierdzam, że przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Wiktorii Frankiewicz pt. *“Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych za pomocą HPLC/DAD”* spełnia wymogi właściwej ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym w związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Dyscypliny Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego o przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr Wiktorii Frankiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Dr hab. Szymon Bocian. prof. UMK

