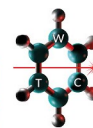




Wojskowa  
Akademia  
Techniczna

Wydział  
Nowych Technologii i Chemii



Warszawa, dn. 22.05.2023 r.

dr hab. Krzysztof Kuśmierk, prof. WAT  
Instytut Chemii, Wydział Nowych Technologii i Chemii  
Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego  
ul. gen. Sylwestra Kaliskiego 2, 00-908 Warszawa

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Wiktorii Frankiewicz

pt.: „*Wykorzystanie soli piryliowych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach biologicznych za pomocą techniki HPLC/DAD*” wykonanej w Zakładzie Dydaktyki Chemii i Popularyzacji Nauki, Katedry Chemii Środowiska na Wydziale Chemii Uniwersytetu Łódzkiego pod kierunkiem Pana dr hab. Roberta Zakrzewskiego, prof. UŁ

Siarka jest jednym z najważniejszych pierwiastków, tzw. makroelementów, wchodzącym w skład wielu substancji aktywnych (aminokwasy i białka strukturalne, hormony, witaminy, enzymy) warunkujących zdrowie i prawidłowe funkcjonowanie całego organizmu. Rola metioniny i powiązanych z nią aminokwasów tiolowych w organizmie jest już stosunkowo dobrze poznana, a nieprawidłowe stężenie cysteiny czy też, przede wszystkim, homocysteiny, jest już obecnie swego rodzaju biomarkerem stanu zdrowotnego organizmu. Siarka występuje w organizmie nie tylko w postaci złożonych związków organicznych, ale również w swojej chyba najprostszej formie – jako siarkowodór i jony siarczkowe. Siarkowodór, przez lata uważany za związek silnie toksyczny, dziś nie jest już tak demonizowany. Choć jego rola w organizmie nie została jeszcze w pełni wyjaśniona i wymaga dalszych badań, pojawiające się w ostatnich latach doniesienia naukowe sugerują, że jest on bardzo istotny w funkcjonowaniu organizmu, a jego rola wcale nie jest taka niekorzystna jak się początkowo

wydawało. Siarkowodór wykazuje zarówno negatywny jak i pozytywny wpływ na funkcjonowanie organizmu człowieka jednak granica pomiędzy działaniem toksycznym a prozdrowotnym jest bardzo wąska i zależy, jak się dziś powszechnie uważa, od jego stężenia w organizmie. Ważne jest zatem posiadanie odpowiednich narzędzi analitycznych pozwalających na monitorowanie poziomu siarkowodoru (jonów siarczkowych) w tkankach i płynach ustrojowych. Dlatego też problem badawczy podjęty przez Panią mgr Wiktorię Frankiewicz, czyli opracowanie nowych procedur analitycznych oznaczania jonów siarczkowych w próbkach biologicznych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detekcją UV-Vis, jest bardzo ważny i jak najbardziej uzasadniony.

Recenzowana praca składa się z typowych elementów i zawiera 129 ponumerowanych stron, 30 tabel, 15 rysunków i 40 wykresów. Tekst został podzielony na dwie główne części – część literaturową i część doświadczalną, a ponadto zawiera wstęp i cel pracy, podsumowanie oraz wnioski końcowe, streszczenie w języku polskim i w języku angielskim, spis stosowanych skrótów i akronimów oraz piśmiennictwo. Bibliografia obejmuje listę 138 zacytowanych źródeł literaturowych, w większości anglojęzycznych. Układ pracy, w tym kolejność poszczególnych rozdziałów i treści w nich przedstawione, jest starannie przemyślany i nie budzi zastrzeżeń. Jedynym mankamentem jest zamieszczony na końcu pracy „Wykaz skrótów”, który nie jest uporządkowany alfabetycznie.

Część literaturowa (niepoprawnie nazwana „teoretyczną”) składa się z trzech głównych podrozdziałów, w których Doktorantka opisała właściwości i zastosowania soli piryliowych, właściwości i zastosowania jonów siarczkowych oraz dokonała przeglądu metod stosowanych do ich oznaczania. Trochę szkoda, że pod koniec tego ostatniego podrozdziału Doktorantka nie zamieściła zbiorczej tabeli (zawierającej m.in. zakresy stężeń, granice wykrywalności itp.), która porównałaby i podsumowała opisane w literaturze metody oznaczania jonów siarczkowych porządkując tym samym aktualny stan wiedzy na ten temat.

W części doświadczalnej Doktorantka zamieściła wyniki badań własnych, których celem było opracowanie nowych metod analitycznych do oznaczania jonów siarczkowych w wybranych matrycach – ludzkim moczu i wątrobie kurzej. Ponieważ, ze względu na niską trwałość, dużą reaktywność oraz brak barwy, bezpośrednie oznaczanie jonów siarczkowych techniką HPLC z detekcją UV-Vis nie jest możliwe, Autorka zastosowała derywatyzację, która jest modyfikacją chemiczną analitu w celu otrzymania nowego związku posiadającego właściwości bardziej odpowiednie dla specyficznej metody analitycznej. Autorka zastosowała dwa odczynniki derywatyzujące (sole piryliowe): wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopirylu

oraz chloran(VII) 4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopiryłu, które w reakcji z jonami siarczkowymi dawały barwne pochodne, odpowiednio wodorosiarczan(VI) 2,4,6-trifenylopiropiryłu oraz chloran(VII) 4-[p-(N,N-dimetyloamino)fenylo]-2,6-difenylopiropiryłu. Bardzo dobrym pomysłem Doktorantki było nadanie skróconych nazw dla obydwu odczynników derywatyzujących oraz uzyskanych pochodnych (odpowiednio L1 i LN1 oraz L3 i LN3) co ograniczyło konieczność stosowania ich pełnych (długich) nazw systematycznych i tym samym ułatwiło czytanie całego tekstu.

Część doświadczalna składa się z rozdziałów poświęconych kolejno: stosowanym odczynnikom, roztworom i aparaturze, stosowanym procedurom oznaczania jonów siarczkowych, oraz trzech rozdziałów, w których przedstawione są szczegółowe wyniki dotyczące opracowania procedur oznaczania jonów siarczkowych w roztworach standardowych, w ludzkim moczu oraz homogenacie tkanki wątroby kurzej. Całość kończy podsumowanie oraz wnioski końcowe. Opracowanie każdej z procedur wymagało optymalizacji jej poszczególnych etapów m.in. warunków rozdzielania chromatograficznego, warunków prowadzenia reakcji derywatyżacji czy homogenizacji. Zoptymalizowane przez Doktorantkę procedury, po ich wcześniejszej kalibracji i walidacji, zostały zastosowane do oznaczania stężenia jonów siarczkowych w próbkach rzeczywistych – w moczu pozornie zdrowych ochotników oraz w homogenacie tkanki wątroby kurzej. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w przejrzysty sposób w postaci licznych tabel i wykresów. Dlatego też całą część eksperymentalną należy ocenić wysoko; poszczególne etapy pracy zostały przez Doktorantkę prawidłowo zaplanowane i zrealizowane co świadczy o jej dojrzałości naukowej oraz bardzo dobrej znajomości warsztatu badawczego. Do przedstawionych wyników w pracy mam jednak kilka uwag i komentarzy, które nie wpływają znacząco na moją ogólną ocenę rozprawy doktorskiej:

- Nie do końca zgadzają mi się opisane na stronie 42 procedury przygotowania buforu fosforanowego i buforu TRIS. Autorka podaje, że roztwory odpowiednio diwodorofosforanu(V) sodu i tris(hydroksymetylo)aminometanu były „doprowadzane do odpowiedniego pH wobec elektrody szklanej”; nie podaje jednak za pomocą jakich odczynników. O ile pamiętam w przypadku klasycznego buforu fosforanowego powinien to być roztwór wodorofosforanu(V) sodu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) a w przypadku buforu TRIS roztwór kwasu solnego o odpowiednim stężeniu.

- W jakich jednostkach jest wyrażona „Absorbancja” na wykresach 1 i 2?

- W rozdziale 3.6.1.1. „Optymalizacja warunków chromatograficznych” zostały zamieszczone ostateczne (optymalne) warunki chromatograficzne. Moim zdaniem trochę szkoda, że Autorka nie pokazała żadnych wyników (zależności), chociażby wpływy składu i pH fazy ruchomej na rozdzielanie, co znacznie podniosłoby wartość tego rozdziału.

- W tabeli 18 lepszym rozwiązaniem byłoby wyznaczenie stężenia kreatyniny dla każdego pomiaru (piku) i następnie wartości średniej, SD i RSD już dla stężeń kreatyniny a nie dla pola powierzchni pików. W ten sposób odchylenie standardowe (SD) byłoby wyrażone w jednostkach stężenia kreatyniny a nie w [mAU·s].

- Nie do końca są dla mnie zrozumiałe uzyskane i przedstawione w tabelach 7, 9, 11, 13, 23 i 25 stężenia jonu siarczkowego odpowiednio: „intra-day”, „up-day” i „inter-day”. Względne odchylenie standardowe będące miarą precyzji metody jest najczęściej obliczane dla danych uzyskanych w ciągu jednego dnia („intra-day”) oraz w okresie kilku kolejnych dni („inter-day”). Proszę o komentarz w tej sprawie.

- W tabelach 19 i 20 Autorka zamieściła uzyskane znormalizowane stężenia jonów siarczkowych w ludzkim moczu. Ciekawi mnie jak te wartości mają się do danych literaturowych? Czy takie dane są dostępne w pracach innych autorów?

- W podsumowaniu, na stronie 110, Doktorantka stwierdza, że obie opracowane metody charakteryzują się liniowością w zakresie stężeń odpowiednio 20-1500 nmol/l i 10-500 nmol/l. W tabelach 8 i 10 te same zakresy odnoszą się do liczby moli jonów siarczkowych wprowadzonych do kolumny i wyrażonych w nanomolach. Tak więc czy ilość nanomoli jonów siarczkowych w pikach odpowiada ich zawartości w przeliczeniu na litr roztworu (nmol/l)?

Podsumowując, generalnie cała rozprawa doktorska napisana jest poprawnym językiem, strona edytorska również stoi na wysokim poziomie. Muszę tu jednak wspomnieć, że nie podoba mi się stosowany przez Doktorantkę opis tabel – „pod tabelą”. W literaturze naukowej przyjęło się, że wykresy i rysunki opisujemy „pod” nimi, a opisy tabel umieszczamy na górze – „nad” tabelą. Taki, odmienny sposób opisu konsekwentnie stosowany przez Doktorantkę nie wpływa oczywiście na wartość merytoryczną pracy, ale przyznam szczerze, trochę utrudnia czytanie tekstu.

Niestety Autorka nie ustrzegła się kilku potknięć językowych używając niewłaściwej nomenklatury i sformułowań oraz tzw. żargonu laboratoryjnego, np.:

- „matryca fotodiodowa (DAD)” – powinno być „matryca diodowa” co wynika chociażby z dosłownego przetłumaczenia akronimu DAD (diode array detector);
- „rozdzielenie przy pomocy kolumny” str. 32 – powinno być „rozdzielenie za pomocą kolumny”;
- „ependorfy”, „przeniosłam do ependorfów” – powinno być „probówki Eppendorfa”, „przeniosłam do probówek Eppendorfa”;
- „falkony”, „umieściłam w falkonie” – powinno być „probówki typu Falcon”;
- „septa” – powinno być „membrana”;
- „zamrażalka” – powinno być „zamrażarka”;
- na stronie 39 „wielkość cząsteczek 4  $\mu\text{m}$ , powierzchnia 130  $\text{m}^2/\text{g}$ ” – powinno być „wielkość cząstek 4  $\mu\text{m}$ , powierzchnia właściwa 130  $\text{m}^2/\text{g}$ ”;
- „supernatant” – powinno być „roztwór nad osadem”;
- „prosta kalibracyjna” czy też „prosta wzorcowa” – powinno być „krzywa kalibracyjna” lub „krzywa wzorcowa”;
- na stronie 118 „LC-MS - detektor tandemowy spektrometrii mas” – akronim LC-MC oznacza chromatograf cieczowy połączony ze spektrometrem mas;
- na stronie 118 „FTIR - detektor radiometryczny” – akronim FTIR oznacza spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera;
- na stronie 118 „NMR - detektor polarymetryczny” – akronim NMR oznacza spektroskopię magnetycznego rezonansu jądrowego.

Przytoczone powyżej uwagi nie umniejszają pracy i nie wpływają na moją ocenę jej wartości merytorycznej. Stwierdzam, że praca doktorska Pani mgr Wiktorii Frankiewicz dotyczy aktualnych i istotnych z praktycznego punktu widzenia zagadnień i posiada wiele elementów nowości naukowej. Metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, sposób prezentacji wyników jest jasny i czytelny, zaś ich interpretacja właściwa. W moim przekonaniu opiniowana rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim w świetle obowiązujących przepisów i w związku z tym zwracam się do Komisji Uniwersytetu Łódzkiego ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie Nauki Chemiczne z wnioskiem o jej przyjęcie i dopuszczenie Pani magister do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

*Antoni Kisielecki*