



**UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI**  
**WYDZIAŁ CHEMII**

ul. Gronostajowa 2, 30-387 KRAKÓW  
tel. (12) 686-24-11; fax: (12) 633-22-32

Kraków, 4 stycznia 2019 r.

**Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Marty Fiedoruk-Pogrebniak**  
**pt. „Przepływowe detektory optoelektroniczne do oznaczania jonów fosforanowych i ich**  
**zastosowania analityczne”**

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Marty Fiedoruk-Pogrebniak należy do prac z zakresu chemii analitycznej. Autorka podjęła w niej tematykę analizy przepływowej, a w szczególności problemy zastosowania analitycznych układów przepływowych z detekcją optoelektroniczną do oznaczania jonów fosforanowych i wykorzystania tego typu układów w praktyce analitycznej.

Gwałtowny postęp technologiczny notowany w ostatnich dziesięcioleciach przyczynił się do powstania nowoczesnych, w pełni zautomatyzowanych – choć zwykle rozmiarowo dużych i zwykle bardzo kosztownych – analitycznych instrumentów pomiarowych, dzięki którym pomiar sygnału dla oznaczanej substancji stał się procesem szybkim, precyzyjnym i dokładnym. W tej sytuacji wstępne etapy przygotowania próbki do pomiaru pozostały czasochłonnymi i żmudnymi zabiegami laboratoryjnymi, decydującymi o rzetelności, sprawności i kosztochłonności wykonywanych analiz. W celu instrumentalnego usprawnienia tych zabiegów kilkadziesiąt lat temu zaproponowano techniki przepływowe, polegające na transporcie próbki do aparatu pomiarowego w formie strumienia cieczy i ustalaniu jej warunków fizykochemicznych w trakcie tego transportu. Z biegiem czasu opracowano szereg różnych technik przepływowego traktowania próbki przed pomiarem, a w miarę uzyskiwania dowodów na to, że takie postępowanie może pozwolić dodatkowo na poprawę parametrów analitycznych stosowanych metod, analiza przepływowa stała się osobną dziedziną chemii analitycznej.

Dzisiaj analiza przepływowa rozwija się głównie pod względem instrumentalnym w kierunku, który można ogólnie określić jako sprzyjający regułom tzw. „zielonej chemii analitycznej”. Chodzi przede wszystkim o konstruowanie takich układów przepływowych, które przy zachowaniu pełnej rzetelności uzyskiwanych wyników analitycznych zapewniają małe zużycie odczynników i próbek, a

także są stosunkowo tanie i niewielkie rozmiarowo, umożliwiając powszechne ich wykorzystanie w dowolnych warunkach (np. dla celów analizy klinicznej i środowiskowej). Tendencja ta wymaga nie tylko doskonalenia w tym kierunku rozmaitych narzędzi technik przygotowania próbki do pomiaru, ale również odpowiedniej modyfikacji urządzeń pomiarowych (detekcyjnych) w stronę ich miniaturyzacji oraz zmniejszania kosztów wytwarzania i użytkowania.

W ten nurt nowoczesnego rozwoju analizy przepływowej znakomicie wpisują się prace naukowe prowadzone w zespole badawczym Wydziału Chemii Uniwersytetu Warszawskiego kierowanym przez prof. dr hab. Roberta Konckiego, a praca doktorska członka tego zespołu – Pani mgr Marty Fiedoruk-Pogrebniak – jest bardzo dobrym przykładem wysiłków naukowych ten właśnie nurt reprezentujących. Tematykę tej pracy uważam zatem za aktualną i ważną zarówno z naukowego, jak i aplikacyjnego punktu widzenia.

Praca doktorska liczy 144 strony i jest podzielona zasadniczo na dwie części: część literaturową i doświadczalną. W trakcie redakcji pracy Autorka korzystała ze 189 pozycji literaturowych, na które złożyły się książki monograficzne i artykuły zamieszczone w fachowych czasopismach naukowych.

W części literaturowej (44 strony) Doktorantka najpierw ogólnie zapoznała czytelnika z wybraną problematyką badawczą i uzasadniła podjęcie zaplanowanych badań, a następnie zajęła się głównymi aspektami związanymi z tematyką jej pracy: przedstawiła i scharakteryzowała przedmiot badań, zebrała i omówiła metody oznaczania jonów fosforanowych, a osobny rozdział poświęciła budowie i działaniu detektorów optoelektronicznych. Całość jest napisana w stosunkowo zwięzły ale interesujący sposób, świadczący o dużym zainteresowaniu Autorki wybraną tematyką i o jej dużej wiedzy w tym zakresie. Szczególnie dobre wrażenie robi dokonany przegląd literaturowy procedur oznaczania jonów fosforanowych, uwzględniający rozmaite metody i techniki analityczne. Szkoda może tylko, że Autorka nie odniosła się w tej części do normatywnych przepisów analitycznych dotyczących oznaczania fosforanów technikami analizy wstrzykowej (PN-EN ISO 15681-1:2006) i ciągłej (PN-EN ISO 15681-2:2006), które choć dotyczą analizy wód, to jako stosunkowo nieliczne spośród norm ISO polecają i zalecają wykorzystanie trybu przepływowego w laboratoriach analiz rutynowych i seryjnych. Byłoby również, moim zdaniem, wskazane, by ze względu na różnorodność form chemicznych i rzędowości fosforanów zaznaczyć na samym początku, że praca dotyczy w zasadzie oznaczania jonów fosforanowych choć analiz jest często określany w tekście inaczej (tj. jako „fosforany” czy „ortofosforany”).

Część doświadczalna (nazwana przez Autorkę „Badania własne”) ma tradycyjny układ: składa się z opisu celu i planu badań, zebranej bazy odczynnikowej i aparaturowej, a następnie z sześciu rozdziałów przedstawiających przebieg kolejnych badań, z których każde stanowi odrębną całość. Na koniec Autorka dokonała krótkiego podsumowania wyników swoich prac doświadczalnych. Wszystkie badania zostały wykonane za pomocą układów przepływowych z zainstalowanymi sparowanymi diodami elektroluminescencyjnymi pełniącymi rolę zarówno emitera, jak i detektora promieniowania. Urządzenia te, oryginalnie skonstruowane w laboratorium Autorki, pozwalały na

wykonywanie oznaczeń fotometrycznych i fluorymetrycznych. Skonstruowane układy analityczne pracowały na zasadzie różnych technik przepływowych: multikomutacyjnej (z udziałem pomp i zaworów solenoidowych), wstrzykowo-przepływowej, wstrzykowo-sekwencyjnej i mikrofluidycznej typu Lab-on Paper.

Za cel badań Doktorantka postawiła „opracowanie optoelektronicznego detektora typu PEDD dedykowanego do oznaczania jonów fosforanowych oraz jego wykorzystanie w różnych systemach przepływowych do analizy wielu zróżnicowanych próbek”. Cel ten został w pełni zrealizowany. Skonstruowany detektor (o zróżnicowanych, odpowiednio ustalonych szczegółach konstrukcyjnych), w dużej mierze oryginalny i prototypowy, został bowiem wszechstronnie przetestowany w rozmaitych, pomysłowo skonstruowanych układach przepływowych, a ich użyteczność i walory analityczne sprawdzono na przykładzie analiz o dużym znaczeniu z punktu widzenia ochrony środowiska i zdrowia, a mianowicie dotyczących oznaczania jonów fosforanowych w próbkach żywności (soków i napojów), surowicy krwi (w celu wyznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej), płynie podializacyjnym (w celu monitorowania zabiegów hemodializacyjnych) oraz w próbkach gleb. Co więcej, wykazano możliwość wykorzystania tego typu detektora do jednoczesnego oznaczania jonów fosforanowych i wapniowych w surowicy krwi.

Prace doświadczalne Doktorantka przedstawiła w sposób klarowny, logiczny i systematyczny, i wykonała je starannie, na ogół przy zachowaniu wszystkich zasad poprawnego opracowywania metod analitycznych. W każdym przypadku uzasadniała cel wykonywanych badań, przedstawiała budowę i parametry stosowanego układu instrumentalnego, opisywała przebieg etapów optymalizacji i walidacji, a opracowaną metodę sprawdzała najpierw w analizie próbek modelowych, a następnie stosowała do analizy próbek rzeczywistych. Otrzymane wyniki omawiała i podsumowywała. Opisane badania doświadczalne stanowią nie tylko najbardziej istotną, ale też bardzo interesującą i pouczającą część rozprawy.

Na podstawie tych wszechstronnych i starannych badań Autorka udowodniła, że detektory optoelektroniczne mogą współpracować z różnymi układami przepływowymi, pozwalając na wykonywanie analiz różnorodnych próbek o złożonym składzie i osiągania wyników o satysfakcjonujących parametrach analitycznych. Opracowane układy charakteryzują się niewielkim kosztem wytworzenia i użytkowania, łatwością obsługi i mechanizacji, możliwością pełnej kontroli komputerowej i stosunkowo niewielkim zużyciem odczynników i próbek. Dodatkowym ich walorem jest niewielki rozmiar, co ułatwia ich użytkowanie w warunkach szpitalnych i polowych.

Rozprawa w całości ma dużą wartość naukową, a na tę ocenę wpływają w szczególności następujące aspekty:

- Jak wspomniano, praca dotyczy bardzo ważnej i interesującej tematyki badawczej, co udało się Autorce nie tylko dostrzec, ale przede wszystkim udowodnić i udokumentować zarówno studiami literaturowymi, jak i przebiegiem badań i ich wynikami.

- Wykonane badania mają w dużej mierze charakter nowatorski i charakteryzują się sporymi walorami naukowymi. Nie przedstawiam szczegółowej analizy naukowych aspektów pracy, ponieważ najlepszym dowodem jej wartości pod tym względem jest jej częściowe opublikowanie w postaci artykułów naukowych w renomowanych czasopismach analitycznych z tzw. listy filadelfijskiej (Talanta, Pharmaceutical and Biomedical Analysis, Sensors and Actuators).
- Wykonane badania mają bardzo szeroki zakres w odniesieniu zarówno do szerokiej gamy różnorodnych układów przepływowych, jak i obszarów analitycznego ich wykorzystania.
- Niektóre prace badawcze zostały wykonane i opisane ze szczególnie dużą starannością i skrupulatnością. W szczególności dotyczy badań nad systemem przepływowym do oznaczania jonów fosforanowych w próbkach gleb (rozd. 11) i nad systemem mikrolitycznym do oznaczania jonów fosforanowych i wapniowych (rozd. 12). Należy przy tym zaznaczyć, że koncepcja połączenia detektora optoelektronicznego z układem mikrofluidycznym typu Lab-on-Paper nie pojawiła się wcześniej w literaturze naukowej.
- Na osobne podkreślenie zasługuje wykazywane przez Autorkę podejście do oceny dokładności opracowanych metod analitycznych, rzadko spotykane w podobnych analitycznych pracach naukowych. Otóż na ogół dokładność sprawdza na podstawie porównania otrzymanych wyników z wynikami uzyskanymi innymi metodami opartymi na odmiennych zasadach. W nielicznych tylko przypadkach wykorzystuje do tego celu powszechnie ostatnio stosowaną metodę odzysku, ale uzyskane wtedy wyniki interpretuje poprawnie unikając pułapek wynikających z zasady tej metody.

Niestety, praca nie jest wolna od pewnych błędów i uchybień merytorycznych. Najpoważniejszy zarzut sprowadza się do niepełnej walidacji metod opracowanych przez Autorkę, a w szczególności do braku – w większości przypadków - jasnych, liczbowych danych dotyczących powtarzalności i odtwarzalności wyników analitycznych otrzymywanych tymi metodami. Przedziały ufności zaznaczone na wykresach kalibracyjnych (tyko zresztą w niektórych przypadkach) są jedynie namiastką tego typu informacji. Utrudnia to dokonanie pełnej oceny rzetelności omawianych metod, a w pewnych przypadkach może budzić pewne wątpliwości w tym względzie. Aby nie być gołosłownym, wystarczy przywołać procedurę analizy dwuskładnikowej w układzie przepływowym służącym do diagnostyki fosfatemii i kalcemii: niektóre wyniki oznaczania wapnia w próbkach rzeczywistych są tak bliskie granicy oznaczalności tego pierwiastka (po uwzględnieniu 40-stokrotnego rozcieńczenia próbek), że przy dużych odchyleniach przypadkowych pojedyncze rezultaty otrzymanej dla danej próbki mogą tracić sens analityczny.

Zwieńczeniem pracy nad każdą nową procedurą analityczną są wyniki otrzymane po jej zastosowaniu do analizy próbek rzeczywistych. Wyniki takie należy zawsze przedyskutować i ocenić, a tego typu podejścia brakuje w pracy w niektórych przypadkach. I tak, wyniki oznaczania jonów fosforanowych w sokach i napojach otrzymane w pomiarach fotometrycznych zostały jedynie przedstawione w korelacji z wynikami fluorymetrycznymi (str. 55), choć z pewnością interesujący

byłby pogląd Autorki np. na zróżnicowane ich stężenia w różnych próbkach. Brak jest też jakiegokolwiek dyskusji wyników analiz próbek surowicy krwi pod kątem wyznaczania aktywności fosfatazy alkalicznej (str. 95). Jest to o tyle rażące, że gdzie indziej (np. przypadku oznaczania jonów fosforanowych w próbkach gleb) Autorka wykazuje dużo większą staranność pod tym względem.

Osobny, poważny zarzut stanowi brak wniosków wypływających z przeprowadzonych badań. Podrozdziały „Posumowanie” umieszczone po każdym badaniu i końcowy rozdział pod tym samym tytułem zawierają jedynie szczątkowe elementy wnioskowania. Brak jest przede wszystkim dużo bardziej dogłębnej oceny każdej opracowanej metody, podkreślenia nie tylko zalet, ale również wad i ograniczeń oraz propozycji ich usunięcia. W końcowym rozdziale z pewnością należało porównać opracowane podejścia analityczne i zastanowić się, jak na ich ogólną ocenę wpływa użycie detektora optoelektronicznego (w konfrontacji z użyciem innego detektora). Dobrze byłoby również przeczytać, jakie jest zdanie Autorki o możliwościach i perspektywach rozwoju przepływowych metod analitycznych z zastosowaniem zastosowanego detektora. Wnioski to zawsze ten fragment pracy naukowej, który w największym stopniu odkrywa osobistą, autorską ocenę uzyskanych wyników, a także znaczenia wykonanych badań i możliwości ich wykorzystania. Szkoda więc, że takiego twórczego odniesienia nie znalazłem w pracy Autorki.

Praca jest zredagowana starannie. Zamieszczone rysunki i tabele są dość czytelne (choć rysunki mogłyby być trochę większe), opatrzone na ogół wyczerpującymi podpisami. Autorka posługuje się na ogół ładnym i klarownym językiem, bez używania zwrotów anglojęzycznych i żargonowych, stosując z reguły – co jest szczególnie ważne i godne podkreślenia – poprawną nomenklaturę analityczną. Spore moje zastrzeżenia budzą jednak pewne niepoprawne nawyki Autorki, które choć są teraz widoczne w wielu pracach przedstawicieli „młodego pokolenia”, to jednak ich występowanie w tej pracy jest dla mnie zaskoczeniem. Chodzi mi przede wszystkim o nagminne, wręcz dla mnie niezrozumiałe i w ogromnej większości przypadków nieuzasadnione (wynikające zapewne z nauczania szkolnego) stosowanie przez Autorkę łącznika „oraz” zamiast „i”. Rażące jest również niemal wyłączne stosowanie określeń „niższy” i „wyższy” zamiast „mniejszy” i „większy” w stosunku do różnych wielkości (np. str. 98), a w szczególności do stężenia substancji (np. str. 21, 76, 97).

Inne uchybienia językowe mają raczej charakter przypadkowy i dotyczą mniej lub bardziej błędnych określeń i pojęć, np: „ilość” (zamiast „liczba”) w odniesieniu do próbek (str. 8) czy atomów (str. 21), „k. oddechowa” i „k. metaboliczna” (str. 10) zamiast pełnych nazw, „analityka klinicystyczna” (w tytule podrozdziału na str. 14) zamiast „analityka kliniczna”, „oznaczona zawartość fosforanów” (str. 36) zamiast „wyznaczona zawartość fosforanów”, „moment czasowy” (str. 67) zamiast po prostu „moment”. Ponadto:

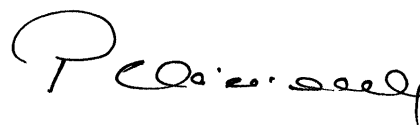
- zdanie rozpoczynające rozdział 3. jest powtórzone kilka wierszy niżej,
- ostatnie zdanie na str. 80 jest językowo całkowicie dla mnie niezrozumiałe,

- podpisy pod rysunkami 47 i 53, 48 i 54 oraz 49 i 55 są – wbrew regułom poprawnej pracy naukowej – identyczne, a powinny informować, że odnoszą się do oznaczeń z detekcją odpowiednio fotometryczną i fluorymetryczną,
- za niepoprawne uważam określenie „oznaczanie aktywności fosfatazy alkalicznej” (m.in. w tytule rozdz. 10) ponieważ z definicji termin „oznaczanie” odnosi się do „ilościowego określania zawartości danego składnika w badanej próbce” (Słownik chemii analitycznej, WNT, Warszawa 1984, str. 104), a aktywność nie jest składnikiem próbki lecz właściwością fizykochemiczną enzymu; lepiej więc w tym przypadku mówić o „wyznaczeniu aktywności fosfatazy alkalicznej” poprzez „oznaczanie jonów fosforanowych”,
- nie podoba mi się również dość często używane przez Autorkę określenie „przebieg kalibracji”, pod którym rozumie ona nie tyle – jak można byłoby przypuszczać – przebieg całego postępowania kalibracyjnego, ale jedynie obraz sygnałów analitycznych otrzymanych dla określonej serii roztworów wzorcowych,
- na str. 49 Autorka pisze, że „reakcja powstawania błękitu molibdenowego ma charakter kinetyczny” - zachodzi pytanie, czy jakakolwiek reakcja chemiczna może nie mieć takiego charakteru.

Jak na tak obszerną pracę wymienionych uchybień nie jest wiele, a niektóre są zapewne dyskusyjne i może nawet nie warto byłoby je wymieniać, gdyby nie to, że – jak wiem z własnego doświadczenia – zwrócenie uwagi na tego typu błędy właśnie w rozprawie doktorskiej powoduje, że autor dobrze je zapamiętuje i unika w dalszej karierze zawodowej.

Pomimo wszystkich uwag krytycznych uważam, że ze względu na walory naukowe i inne wyżej wymienione aspekty rozprawa jest bardzo wartościowa i niewątpliwie zasługuje na pozytywną ocenę. Świadczy ona o dużej pracowitości i samodzielności badawczej Autorki oraz o swobodzie poruszania się – tak w sensie teoretycznym, jak i praktycznym – w różnorodnych, niejednokrotnie specyficznych i trudnych zagadnieniach analitycznych.

Stwierdzam zatem, że rozprawa doktorska Pani mgr Marty Fiedoruk-Pogrebniak spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim (ustawa a dnia 14 marca 2003 r., Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595) i stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. dr hab. Paweł Kościelniak