

Olsztyn, 24.01.2022 r.

Dr hab. Stanisława Koronkiewicz
Katedra Chemii
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Pl. Łódzki 4, 10-727 Olsztyn
tel. (89) 523-41-37
email: stankor@uwm.edu.pl

Recenzja

rozprawy doktorskiej mgr **Natalii Rybkowskiej-Kucharczyk** zatytułowanej
„Optoelektroniczne detektory fotometryczne do oznaczania jonów żelaza w przepływowych systemach analitycznych” wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

Przedstawiona do recenzji praca dotyczy opracowania i przetestowania w warunkach przepływowych optoelektronicznych detektorów fotometrycznych bazujących na sparowanych diodach LED. Detektory te dedykowane były do oznaczania jonów żelaza z wykorzystaniem różnych chromogenów. Swoją pracę doktorską mgr Natalia Rybkowska-Kucharczyk przygotowywała pod opieką naukową Pana prof. dr hab. Roberta Konckiego oraz Pana dr Kamila Strzelaka.

Techniki przepływowe, rozwijane od lat 70-tych XX wieku, są nadal atrakcyjnym narzędziem w wielu obszarach analizy chemicznej, w szczególności w analizach rutynowych. Najnowsze rozwiązania techniczne opracowywane są m.in. dzięki wykorzystaniu elektronicznie sterowanych elementów takich, jak mikropompy oraz wielodrożne zawory sterowane za pomocą elektromagnesów. Techniki przepływowe oparte na zastosowaniu tych elementów są rozwijane intensywnie od lat 90-tych XX wieku. Mikropompy i zawory elektromagnetyczne, nazywane przez mgr Rybkowską-Kucharczyk z angielska „solenoidowymi”, stosowane są w technikach przepływowych typu MPFS (ang. *Multi Pumping Flow System*) oraz w multikomutacyjnej analizie przepływowej (ang. *Multicommuation Flow Analysis*, MCFA). Dość typowym już w tej chwili rozwiązaniem jest łączenie mikropomp i zaworów w sieć sprzężonych ze sobą elementów, które można programować, jak robiła to Doktorantka. Pozwala to m.in. na miniaturyzację całego systemu przepływowego. Można też ograniczyć ilość wprowadzanych do systemu odczynników, gdyż nie jest konieczny ciągły

przepływ cieczy. Zalety te mgr N. Rybkowska-Kucharczyk w trakcie prowadzonych badań skutecznie wykorzystywała.

Do pomiaru absorbancji Autorka wykorzystywała system sparowanych diod LED (ang. *paired emission-detection diodes*, PEDD). Jedną z diod LED była źródłem niemal monochromatycznego światła, dzięki czemu nie było konieczne stosowanie skomplikowanego układu optycznego z monochromatorem, jak to ma miejsce w przypadku klasycznych spektrofotometrów. Drugą z diod LED pełniła funkcję fotodiody o wąskim paśmie czułości spektralnej. Zastosowania analityczne układów PEDD są znane od kilkunastu lat. Dzięki nim można obniżyć koszty analiz oraz zminiaturyzować i znacznie uprościć układ detekcyjny, uzyskując moduł dedykowany do konkretnego oznaczenia. Podsumowując, tematyka badawcza podjęta w omawianej pracy wpisuje się doskonale w nurt współczesnej chemii analitycznej.

Przedstawiona do recenzji praca jest spójna tematycznie a wyniki badań będące podstawą pracy doktorskiej zostały opublikowane w czołowych czasopismach związanych z chemią analityczną i znajdujących się w bazie *Journal Citation Reports* (*Analytica Chimica Acta*; *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; *Sensors and Actuators B: Chemical*). Świadczy to o nowatorskim charakterze prowadzonych badań i wysokim poziomie naukowym. Do rozprawy dołączony został spis wszystkich prac naukowych doktorantki, na który składają się w sumie 3 wartościowe publikacje w czasopismach recenzowanych (wysoki sumaryczny $IF_{2020}=17,953$) oraz 1 rozdział w książce o zasięgu międzynarodowym. Na uwagę zasługuje fakt, że znacząca większość tego dorobku związana jest bezpośrednio z tematem pracy doktorskiej. W dwóch publikacjach mgr N. Rybkowska-Kucharczyk występuje jako pierwszy autor, a w jednej, dodatkowo, jako autor korespondencyjny.

Rozprawa jest napisana z dużą znajomością tematu, w sposób zwięzły i systematyczny. Zredagowana została w języku polskim i obejmuje w sumie 132 strony tekstu, wliczając w to m.in. obszerny przegląd literatury (łącznie 204 pozycje). Układ pracy jest typowy. Na początku praca zawiera krótkie, jednostronicowe wprowadzenie. Następne 38 stron, podzielonych na 5 rozdziałów, to omówienie aktualnego stanu wiedzy związanego z prowadzonymi przez doktorantkę badaniami naukowymi. Poszczególne rozdziały są napisane z dużą znajomością tematu i w sposób przejrzysty. Jedyne czego mi tu brakuje, to może nieco innego wyważenia objętościowego rozdziałów. W moim odczuciu, więcej uwagi należało poświęcić analizie przepływowej (rozdział 5; 6 stron w tym 5 rysunków i 2 tabele), a nieco mniej opisowi znaczenia żelaza w organizmie ludzkim (rozdział 2; w sumie 17 stron). W części literaturowej nie brak też drobnych potknięć, jak np. nieprawidłowo zapisane równanie reakcji (4) na str. 25.

Niemniej należy podkreślić, że znalazły się tu wszystkie niezbędne do zrozumienia tematu informacje. Podążanie za tekstem ułatwiają bardzo estetycznie i starannie przygotowane rysunki (w sumie 19). Różnego rodzaju dane liczbowe są w sposób syntetyczny zebrane i przedstawione w tabelach (w sumie 7).

Treść pierwszych rozdziałów, które można by nazwać „częścią literaturową” jest spójna z częścią zawierającą opis badań własnych Autorki (rozdziały 6-14, w sumie 72 strony). Sprecyzowany został tu cel i zakres badań, opisano stosowane techniki pomiarowe. Kolejne rozdziały to systematyczny i szczegółowy opis aparatury, akcesoriów i odczynników oraz badań wstępnych związanych z optymalizacją układów przepływowych od strony chemicznej oraz aparaturowej. W sumie skonstruowano i przetestowano cztery, dość mocno różniące się od siebie systemy przepływowe dedykowane do oznaczeń jonów żelaza:

- pierwszy z nich służył w zasadzie tylko do optymalizacji warunków pomiarowych i był wykorzystywany do oznaczeń jonów żelaza w roztworach wzorcowych (Rys. 32, rozdział 10);
- drugi system (Rys. 45) stosowany był do oznaczania jonów żelaza w preparatach farmaceutycznych (rozdział 11);
- trzeci (Rys. 51) to dość złożony system dedykowany do analizy zawartości jonów żelaza w surowicy krwi (rozdział 12);
- czwarty (Rys. 58), najbardziej skomplikowany, został opracowany z myślą o badaniach specjacji żelaza w materiale biologicznym.

I tu nasuwa się szereg pytań i komentarzy związanych przede wszystkim z optymalizacją tych systemów:

1. Dlaczego optymalizacja układów przepływowych wykonana została tylko dla pierwszego, najprostszego systemu? Dlaczego nie optymalizowano pozostałych układów dedykowanych do oznaczeń w próbkach rzeczywistych?
2. W jaki sposób wyznaczano widmo emisyjne (dla diody-emiter) oraz widmo absorpcyjne, czyli czułość spektralną (dla diody-detektor)?
3. Czy nie obserwowano problemów z powtarzalnością wyników związaną z pojawianiem się w systemie przepływowym pęcherzyków gazu?
4. Jaka była optymalna szybkość przepływu? Związana jest ona z parametrami pracy samych mikropomp (tzn. częstotliwością „wstrzyknięć”), ale też z takimi parametrami jak nominalna objętość mikropomp. W pracy nie podano tych parametrów.

5. Dlaczego nie wykorzystywano mikropomp jako dozowników cieczy, czyli czegoś na kształt „przepływowych mikropipet”? Jest to dość powszechnie stosowana praktyka.
6. Czy optymalizacja oznaczeń związana z doбором odpowiedniego stężenia reagentów (tzw. optymalizacja „chemiczna”) wykonywana była tylko w warunkach stacjonarnych? Czy w jakiś sposób wzięto pod uwagę fakt, że w systemach przepływowych następuje dyspersja tych roztworów?
7. W jaki sposób wszystkie mikropompy i zawory elektromagnetyczne były ze sobą zsynchronizowane w czasie? Zazwyczaj w publikacjach opisuje się sekwencje pracy tych elementów.
8. Czy sprawdzano wpływ lepkości roztworów na ich szybkość transportowania w systemach przepływowych. Wydaje się, że w przypadku transportu cieczy o tak dużych lepkościach jak surowica potrzebna jest modyfikacja pracy mikropompy.

Jednym z celów pracy było sprawdzenie i zademonstrowanie użyteczności praktycznej opracowanych systemów. Ostatnie rozdziały rozprawy dotyczą oznaczeń żelaza w próbkach rzeczywistych. W tym celu zastosowano te układy do analizy próbek farmaceutycznych (rozdział 11) i klinicznych (rozdział 12) oraz do wyznaczania parametrów klinicznych związanych z metabolizmem żelaza (rozdział 13). W moim mniemaniu, największym mankamentem pracy jest mało precyzyjna ocena opisywanych systemów przepływowych pod względem ich parametrów analitycznych, tzn. walidacja tych metod. W rozdziale 11 porównywana i komentowana jest co prawda czułość metod (na podstawie nachylenia wykresów kalibracyjnych) oraz powtarzalność wyników. Brakuje mi jednak dyskusji związanej z brakiem liniowości w przypadku części wykresów kalibracyjnych (kalibracja z wykorzystaniem ferenu s). Poza tym wykresy wzorcowe często przedstawiane są w pracy bez poprowadzenia regresji liniowej (np. Rys. 25, 26, 28, 52), na zasadzie łączenia punktu z punktem, mimo, że na ich podstawie porównywane są czułości metod! Nie dla wszystkich systemów oszacowano takie parametry jak granica wykrywalności i oznaczalności, precyzja i dokładność. W przypadku oznaczeń próbek rzeczywistych z wykorzystaniem preparatów farmaceutycznych porównano co prawda uzyskane wyniki do wyników otrzymanych metodą referencyjną (Rys. 48), ale nie dokonano żadnej oceny statystycznej tej zbieżności (np. test t-Studenta). Nieco lepiej wygląda to w rozdziałach 12 i 13, ale generalnie wykorzystanie metod statystycznych w analizie i ocenie otrzymanych wyników stoi w pracy na dość niskim poziomie.

Należy jednak podkreślić, że przeprowadzone dyskusje wyników, mimo, że często lakoniczne, w większości są poprawne. Jediną uwagą jaką można by mieć na tym etapie, to brak dokładniejszego porównania opracowanych metod z podobnymi metodami przepływowymi opisanymi w literaturze. Można było to zrobić np. w postaci tabeli, co mam nadzieję Autorka uczyni w trakcie obrony pracy doktorskiej.

Język rozprawy, zarówno pod względem gramatycznym, stylistycznym jak i merytorycznym jest dobry, nie licząc drobnych potknięć i przejęzyczeń (np. „przykłady oznaczeń... w „klinikystce”, str. 46; czy „na elektrodę narzucany jest potencjał”, str. 33; „oddzielnym badaniem było sprawdzenie możliwości zastosowanie systemu PEDD-MCFA jako monitora” (?), str. 94; „sygnał ulegał stabilizacji- sygnał był stacjonarny”, str. 108). Trzeba jednak podkreślić, że błędy edycyjne i literowe są nieliczne, co świadczy o dużej staranności w przygotowaniu omawianej rozprawy. Powyższe uwagi i wątpliwości w żaden sposób nie umniejszają mojej oceny całokształtu rozprawy, którą uważam za bardzo wartościową i oceniam wysoko.

W podsumowaniu stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa jest oryginalnym rozwiązaniem problemu naukowego związanego z nowatorskimi rozwiązaniami stosowanymi w analizie przepływowej, co stanowi bardzo interesujący i wartościowy wkład w rozwój współczesnej chemii analitycznej. Pani mgr Natalia Rybkowska-Kucharczyk wykazała się dużą ogólną wiedzą teoretyczną w zakresie dyscypliny Nauki Chemiczne oraz umiejętnościami samodzielnego prowadzenia pracy badawczej. Oceniając pozytywnie recenzowaną pracę stwierdzam, że spełnia ona zarówno warunki ustawowe określone w art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) jak i zwyczajowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z tym wnoszę o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr Natalii Rybkowskiej-Kucharczyk do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Stanisława
Kowalczyk

Olsztyn, 24.01.2022 r.

Dr hab. Stanisława Koronkiewicz
Katedra Chemii
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie
Pl. Łódzki 4, 10-727 Olsztyn
tel. (89) 523-41-37
email: stankor@uwm.edu.pl

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Jako recenzentka rozprawy doktorskiej mgr Natalii Rybkowskiej-Kucharczyk na temat „*Optoelektroniczne detektory fotometryczne do oznaczania jonów żelaza w przepływowych systemach analitycznych*”, wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Konckiego oraz dr Kamila Strzelaka, wnoszę o wyróżnienie tej rozprawy.

Uzasadnienie:

Tematyka badawcza pracy doktorskiej mgr Natalii Rybkowskiej-Kucharczyk stanowi ważną część światowych badań nad opracowywaniem nowoczesnych, zautomatyzowanych systemów analitycznych mogących mieć wykorzystanie m.in. w diagnostyce medycznej. Szczególnie wartościowa jest część pracy związana z systemem do badania specjacji żelaza w surowicy krwi. Opracowane procedury i nowatorski system analityczny, dający możliwość wyznaczenia parametrów metabolizmu żelaza, ma szereg zalet i moim zdaniem duży potencjał aplikacyjny. Wyniki dotyczące tych badań opublikowane zostały w *Analytica Chimica Acta* (IF₂₀₂₀=6,558), jednym z czołowych czasopism z zakresu chemii analitycznej:

Strzelak, K., Rybkowska, N., Wiśniewska, A., Koncki, R., *Photometric flow analysis for biomedical investigations of iron/transferrin speciation in human serum*. *Anal. Chim. Acta* (2017), 995, 43-51.

Stanisława
Koronkiewicz