



# PAŃSTWOWY INSTYTUT WETERYNARYJNY - PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Zakład Farmakologii i Toksykologii – Krajowe Laboratorium Referencyjne  
Al. Partyzantów 57 tel. (81) 889 31 47  
24-100 Puławy fax (81) 886 25 95  
<http://www.piwet.pulawy.pl> e-mail: [zft@piwet.pulawy.pl](mailto:zft@piwet.pulawy.pl)

---

Dr hab. Kamila Mitrowska, prof. instytutu

Puławy, 15.02.2021 r.

## Ocena rozprawy doktorskiej

mgr inż. Justyny Marty Kawki

pt.: „Zastosowanie wybranych technik separacyjnych w analizie jonów organicznych i nieorganicznych w próbkach środowiskowych, płynach ustrojowych i homogenatach tkankowych”

wykonanej w Zakładzie Chemii Analitycznej Katedry Chemii Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Promotor: Prof. dr hab. n. farm. Jolanta Flieger

Promotor pomocniczy: Dr n. farm. Małgorzata Tatarczak-Michalewska

Podstawą dokonania recenzji jest Uchwała Rady Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Analityki Medycznej (obecnie Wydziału Farmaceutycznego) Uniwersytetu Medycznego w Lublinie z dnia 28 lutego 2019 roku i pismo Przewodniczącego Rady ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauk farmaceutycznych Uniwersytetu Medycznego w Lublinie prof. dr hab. n. farm. Dariusza Matosiuka z dnia 8 lutego 2021 roku.

Opracowywanie nowych metod ilościowego oznaczania małych cząsteczek w materiale środowiskowym czy biologicznym stanowi nadal wyzwanie dla analityków. Potrzeba opracowywania nowych metod wiąże się z koniecznością osiągnięcia coraz większej czułości, w krótszym czasie i zgodnie z ideą "zielonej chemii". Wymagania te osiągnięte są najczęściej poprzez stosowanie technik separacyjnych, w tym technik izolacji analitów oraz technik chromatograficznych i elektromigracyjnych, które pozwalają na rozdzielanie i badania składu mieszanin substancji chemicznych. Oprócz zastosowania analitycznego techniki separacyjne używane są również w procesach preparatywnych do wydzielania większych ilości pojedynczej lub kilku substancji z mieszanin nierzadko bardzo złożonych. W tym kontekście przedstawiona do recenzji praca doktorska dokumentująca zastosowanie wybranych technik separacyjnych w analizie jonów organicznych i nieorganicznych w próbkach środowiskowych i biologicznych wpisuje się w aktualne trendy badań.

Rozprawa na stopień doktora napisana przez mgr inż. Justynę Kawkę liczy 179 stron i składa się z rozdziałów obejmujących część teoretyczną, cel pracy, część doświadczalną oraz wnioski. Na końcu rozprawy zamieszczona została bibliografia składająca się z 233 pozycji, spis 64 rysunków i 31 tabel oraz wykaz stosowanych skrótów i symboli.

Część teoretyczną rozpoczyna wprowadzenie, w którym podkreślono znaczenia etapu przygotowania próbki do analizy w procesie analitycznym oraz przedstawiono wymagania stawiane nowym metodom analitycznym. Następnie zaprezentowana została obszerna charakterystyka wybranych płynów biologicznych (ślina, krew i jej pochodne, mocz i ciecz wodnista oka) oraz próbek środowiskowych (powietrze, woda, gleba) w kontekście przygotowania próbki do analizy. Osobiście uważam, że szczegółowo omawiane powinny

być tylko matryce, które są obiektem badań opisywanych w części doświadczalnej tj. ślina, ciecz wodnista oka, woda mineralna, sole lecznicze i liście szpinaku. W kolejnym rozdziale omówiono wybrane metody przygotowania próbek do analizy, w tym ekstrakcję w układzie ciecz-ciecz jak i w układzie ciecz-ciało stałe a także specjację oraz mineralizację. Część teoretyczną zamyka omówienie procesu walidacji procedur analitycznych. Ponieważ część teoretyczna powinna prowadzić do celu pracy, należało umieścić w niej omówienie zastosowania kolumny chromatograficznej z unieruchomioną sztuczną membraną (IAM) (umieszczone dopiero w rozdziale „Wyniki badań i dyskusja”) a także przegląd literatury dotyczący wykorzystywania tworzyw sztucznych w technikach separacyjnych.

Cel pracy został sformułowany jako cztery główne kierunki badań. Pierwszy to oznaczanie zawartości jonów nieorganicznych ( $I^-$ ,  $Br^-$ ,  $NO_3^-$ ,  $NO_2^-$ ,  $SCN^-$ ) w wodach mineralnych, solach leczniczych, ślinie palaczy tytoniu, e-papierosów i osób niepalących z zastosowaniem kolumny z unieruchomioną fosfatydylocholiną (IAM.PC.DD2) i wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym z matrycą diodową (HPLC-DAD). Drugi zaś to badanie właściwości sorpcyjnych wybranych tworzyw sztucznych (polichlorek winylu, polipropylen i polietylen) pod kątem selektywnej izolacji zielonych barwników w przeliczeniu na chlorofil A z ekstraktu z liści szpinaku i analizą z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem oktadecylovym (C18). Trzeci kierunek badań to porównanie własności sorpcyjnych naturalnych i syntetycznych zeolitów na przykładzie sorpcji wybranych metali (chromu, manganu, selenu, niklu, kobaltu i żelaza) z kwaśnych roztworów i analizie techniką atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS) oraz opracowanie warunków eliminacji selenu z próbek wodnych. Ostatni obszar badań miał na celu ocenę składu pierwiastkowego cieczy wodnistej komory przedniej oka u pacjentów z zaćmą po mineralizacji mikrofalowej i analizie techniką spektrometrii emisyjnej z plazmą indukcyjnie sprzężoną (ICP-OES).

Część doświadczalną otwierają podrozdziały: „Materiał”, „Aparatura pomiarowa” i „Metodyka badań”. W podrozdziale „Materiał” powinien znaleźć się wykaz próbek do badań analitycznych a także lista stosowanych w badaniach właściwości sorpcyjnych zeolitów i tworzyw sztucznych. Informacje te zostały umieszczone w dalszej części pracy odpowiednio w rozdziałach „Metodyka badań” i „Wyniki badań i dyskusja”. Pomocne byłoby też zestawienie w jednym miejscu testów statystycznych stosowanych w doświadczeniach.

W dalszej części zawarto podrozdziały opisujące przebieg badań zmierzających do realizacji poszczególnych celów wraz z omówieniem wyników i ich dyskusją, która nie zawsze niestety zawierała element porównania wyników własnych z wynikami innych badaczy. Taką dyskusję, w bardzo zwartej formie, Autorka umieściła dopiero we wnioskach. Ponadto brak jest opisu etapu przygotowywania próbek do analizy IAM-HPLC-DAD. Nie zostały również zaprezentowane wyniki walidacji metody oznaczania jonów jodkowych i bromkowych w solach leczniczych.

Wnioski, z podziałem na cztery główne kierunki określone na etapie formułowania celu badań, zostały ujęte w oddzielnym rozdziale dysertacji i były raczej podsumowaniem i omówieniem wyników.

W wyniku przeprowadzonych badań z zakresu analizy próbek środowiskowych i płynów ustrojowych z wykorzystaniem kolumny z unieruchomioną fosfatydylocholiną pod kątem zawartości jonów nieorganicznych mgr inż. Justyna Kawka wykazała przydatność tej kolumny do oznaczania jonów jodkowych i bromkowych w wodach mineralnych i solach

lecznicych oraz azotanów (III), azotanów (V) i tiocyjanianów w ślinie. Autorka z sukcesem zoptymalizowała w tym zakresie cztery ilościowe metody analityczne, które charakteryzują się krótkim czasem analizy, wysoką czułością oraz łatwą dostępnością, ze względu na wykorzystanie aparatury pomiarowej HPLC-DAD będącej na wyposażeniu większości laboratoriów analitycznych. Dodatkowym atutem metod jest zastosowanie wodnych roztworów soli jako eluentów co wpisuje się w trend „zielonej chemii”. Na uwagę zasługuje fakt, że do oznaczania obecności azotanów (III) i azotanów (V) po raz pierwszy zastosowano kolumnę z unieruchomioną fosfatydylocholiną, którą następnie użyto do pomiaru kinetyki reakcji manganianu (VII) z azotanem (III). Z kolei metoda oznaczania stężenia jonów tiocyjanianowych w ślinie została zastosowana w pionierskich badaniach porównujących poziomy stężeń tych jonów w ślinie palaczy e-papierosów oraz osób niepalących i palaczy tytoniu. Autorka wykazała, że najwyższe stężenia jonów tiocyjanianowych w ślinie obserwowano u palaczy e-papierosów, co jest niezwykle istotną informacją biorąc pod uwagę fakt, że e-papieros zyskały ostatnio dużą popularność. Warto podkreślić, że proponowana metoda stanowi cenne narzędzie do badań przesiewowych określania stężeń jonów tiocyjanianowych w ślinie i może być zastosowana do dalszych badań epidemiologicznych.

Na podstawie badań przeprowadzonych z zakresu oceny właściwości sorpcyjnych wybranych tworzyw sztucznych pod kątem selektywnej izolacji chlorofilu z liści szpinaku mgr inż. Justyna Kawka dowiodła, że polichlorek winylu (PVC) wykazuje oddziaływanie z chlorofilem wystarczające do tworzenia stabilnych kompleksów molekularnych. Fakt ten wykorzystano do ekstrakcji zielonego barwnika z biomasy uzyskując wydajność na poziomie 98% w przeliczeniu na chlorofil A. Opracowano także warunki regeneracji PVC potwierdzając możliwość wielokrotnego użycia polimeru. Dowiedziono również, że PVC jest bardzo skuteczny w usuwaniu nie tylko chlorofilu, ale także niektórych pestycydów. Autorka wykazała, że PVC można z łatwością zastosować jako sorbent do usuwania chlorofilu z ekstraktów lub uzyskiwania ich w stanie czystym na skalę przemysłową, jeśli na etapie produkcji zastosowany zostanie odpowiedni fungicyd. Na uwagę zasługuje fakt, że opracowana metoda wykorzystuje PVC, będący powszechnym produktem odpadowym, który jest trudny w utylizacji.

W kolejnym etapie badań z wykorzystaniem techniki AAS mgr inż. Justyna Kawka wykazała, że naturalne i syntetyczne zeolity charakteryzują się zróżnicowaną zdolnością sorpcji jonów chromu, manganu, selenu, niklu, kobaltu i żelaza z kwaśnych roztworów. Zaproponowała też metodę eliminacji selenu występującego w formie oksoanionu z próbek wodnych za pomocą syntetycznego zeolitu Na-X obciążonego jonami żelaza. Warto podkreślić, że dzięki użyciu tanich materiałów sorpcyjnych i nietoksycznych odczynników metoda ta może być wykorzystana na skalę przemysłową.

Za interesujące uważam badania nad oceną składu pierwiastkowego cieczy wodnistej komory przedniej oka u pacjentów z zaćmą z wykorzystaniem techniki ICP-OES. Mgr inż. Justyna Kawka po raz pierwszy sklasyfikowała ponad sześćdziesiąt pierwiastków z cieczy wodnistej komory przedniej oka pacjentów poddawanych operacji zaćmy i potwierdziła istnienie pięciu niezależnych grup pierwiastków, występujących na różnych poziomach stężeń. Grupa pierwiastków o najwyższym stężeniu zawierała toksyczny tal, tellur, cez, ołów, glin, kadm, bizmut, co potwierdza zwiększoną ekspozycję pacjentów z zaćmą na te pierwiastki toksyczne. Poczynione obserwacje mają wg Autorki znaczenie kliniczne jednakże w mojej opinii dopiero porównanie składu pierwiastkowego cieczy wodnistej komory

przedniej oka u pacjentów z zaćmą do grupy kontrolnej pacjentów bez zaćmy dałoby pełniejszy obraz zależności poziomów pierwiastków od objawów klinicznych.

Poza wątpliwościami przedstawionymi powyżej chciałabym zwrócić uwagę na inne uchybienia:

- W tekście cytowane są strony internetowe odsyłające do nierecenzowanych materiałów szkoleniowych z kursów lub prac z czasopism o charakterze popularno-naukowym, które nie stanowią rzetelnego źródła wiedzy naukowej i nie powinny być wykorzystywane w pracy doktorskiej. Wyjątek stanowią strony internetowe, z których zaczerpnięte były rysunki lub materiały firm na temat ich produktów.
- Widoczny jest brak konsekwencji w stosowaniu jednostek stężenia i jego poprawności. Zamiast ppm powinny być używane jednostki pochodne układu SI, czyli np. mg/l. Brak konsekwencji w stosowaniu widoczny jest również dla współczynnika korelacji, regresji i determinacji, które są zamiennie używane i określane symbolami  $r$  lub  $R^2$ . Podobnie jest z odchyleniem standardowym, dla którego stosowany jest symbol SD lub mniej trafny  $\sqrt{V}$ . Ponadto granica wykrywalności (LOD) często niepoprawnie określana jest jako limit detekcji i przyjmuje skrót DL.
- Spotykane są określenia z żargonu laboratoryjnego jak np. „naważka” co poprawnie powinno być „odważka”, „nastrzyk”, dla którego poprawnym określeniem jest „dozowanie”, „roztwór standardowy” a powinno być „roztwór wzorcowy”, „molekuły” to „cząsteczki” a zamiast „związki analityczne” powinno być „związki chemiczne”.
- Brak rozwinięcia niektórych skrótów m.in.: PDB, UFF, EDS, SEM.
- W większości tabel jako separator dziesiętny w liczbach użyta jest kropka zamiast przecinka.
- Na rysunku 33 odwrotnie opisano wykresy A i B dla zależności malejącego stężenia  $\text{NO}_3^-$  i  $\text{NO}_2^-$  w czasie.
- W opisie rysunku 44 zamiast aceton powinno być acetonowy ekstrakt; w obecnej wersji nie zgadzają się wartości stosunku objętościowego odczynników użytych do ekstrakcji chlorofilu A.

Wymienione wyżej uwagi czy komentarze nie zmieniają mojej bardzo wysokiej oceny dysertacji a jedynie są wskazówkami do ewentualnych poprawek.

Podsumowując przedstawiona do recenzji praca zawiera elementy nowości naukowej a jakość i zakres podjętych badań jest szeroki i imponujący. Wszystkie wyznaczone cele pracy zostały zrealizowane a uzyskane wyniki mają charakter zarówno poznawczy jak i użytkowy. Do realizowanych badań umiejętnie zastosowano różne techniki separacyjne i instrumentalne, co jest bez wątpienia mocną stroną pracy. Ponadto na uznanie zasługuje sprawne posługiwanie się metodami chemometrycznymi w analizowaniu danych chemicznych. Praca doktorska mgr inż. Justyny Kawki spełnia wymagania stawiane tego typu pracom w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (t.j. Dz. U. z 2017 r., poz. 1789, ze zm.) i wnioskuje do Rady Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Medycznego w Lublinie o jej dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką jakość i szeroki zakres przeprowadzonych badań oraz wyjątkowe walory poznawcze i użytkowe, wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.