



dr hab. Barbara Wagner  
Pracownia Teoretycznych Podstaw Chemii Analitycznej  
Wydział Chemii  
Uniwersytet Warszawski  
Pasteura 1  
02-055 Warszawa

Warszawa, 04.04.2018 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr Natalii Łucji Miliszkievicz

pod tytułem: *"Kalibracja oznaczeń techniką spektrometrii mas z mikropróbkowaniem laserowym i jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (LA-ICP-MS)"*

Przedłożona do recenzji praca doktorska mgr Natalii Łucji Miliszkievicz *"Kalibracja oznaczeń techniką spektrometrii mas z mikropróbkowaniem laserowym i jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (LA-ICP-MS)"* została wykonana w Grupie Analitycznej Spektrometrii Atomowej w Zakładzie Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką promotora dr hab. Stanisława Walasa, prof. UJ. Promotorem pomocniczym była dr Anna Talk.

Recenzowana rozprawa doktorska porusza zagadnienia kalibracji wielopierwiastkowych oznaczeń prowadzonych z zastosowaniem intensywnie rozwijanej metody instrumentalnej, wykorzystującej oddziaływanie energii wiązki promieniowania laserowego na etapie pobierania mikro-ilości materiału próbki ciała stałego do analiz ICP-MS. Zakres badań opisanych przez mgr Natalię Łucję Miliszkievicz został rozbudowany o zagadnienia dotyczące możliwości prowadzenia oznaczeń stosunków izotopowych Sr ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ) w kościach ludzkich. W tekście znajdują się opisy literaturowe oraz opisy własnych prac eksperymentalnych, uwzględniające problematykę przygotowania wzorców, stabilności rejestrowanych sygnałów, dyskusję jednorodności nie tylko wzorców, ale także analizowanych próbek. Doktorantka szczegółowo zaprezentowała interferencje spektralne, które należy brać pod uwagę, aby wyniki prowadzonych oznaczeń ilościowych można było uznać za precyzyjne i dokładne, a cały proces działań analitycznych – za profesjonalnie opisany i udokumentowany.

Opracowanie szczegółowych procedur analitycznych, podczas których nowoczesne metody instrumentalne znajdują zastosowanie w badaniach niejednorodnych próbek ciał stałych, a wyniki prowadzonych oznaczeń stanowią cenne źródło informacji dla naukowców z różnych dziedzin nauki (tu: biologii, medycyny, archeologii...) zaliczyć można do obszarów badawczych o wysokim stopniu skomplikowania. Moim zdaniem to ogólne stwierdzenie dotyczy wszystkich interdyscyplinarnych badań prowadzonych na pograniczu kilku dziedzin nauki. Działania analityczne, podejmowane w celu zarejestrowania



sygnałów przeliczanych potem na konkretne dane ilościowe, stanowią oś wszelkich procesów wnioskowania dla dziedzin współuczestniczących w takich badaniach i dlatego wszelkie scenariusze analityczne muszą być opracowane jak najbardziej detalicznie, a możliwe źródła błędów poznane i przedyskutowane w najdrobniejszych szczegółach. Od momentu wprowadzenia metody LA-ICP-MS do laboratoriów wiadomo, że brak dopasowania składu chemicznego dostępnych wzorców ciał stałych do składu chemicznego badanych próbek może prowadzić do przekłamania ostatecznych wyników ilościowych. Zagadnienie to stanowi cel dominującej większości badań podstawowych i eksperymentów prowadzonych z zastosowaniem metody LA-ICP-MS i jemu poświęcona jest recenzowana praca.

Moim zdaniem temat pracy doktorskiej pani mgr Natalii Łucji Miliszkievicz dotyczy aktualnie palących problemów związanych z zastosowaniem coraz bardziej popularnej metody instrumentalnej, której zalety są powszechnie doceniane, ale dopiero głębokie zrozumienie jej ograniczeń pozwala na poprawne wykorzystanie w badaniach ciał stałych. Jednym z takich kluczowych zagadnień jest opracowanie szczegółowych procedur kalibracyjnych dla oznaczeń ilościowych prowadzonych z zastosowaniem spektrometrii mas w układzie LA-ICP-MS.

**Tematyka pracy doktorskiej** mgr Natalii Łucji Miliszkievicz wyrasta z tematyki rozwijanej w grupie badawczej Analitycznej Spektrometrii Atomowej. Optymalizacja warunków oznaczeń i ich walidacja w badaniach związanych z zastosowaniem metod spektrometrii atomowej w analizie pierwiastkowej różnych materiałów jest wymieniana wśród głównych nurtów zainteresowań naukowych tego zespołu, podobnie jak kalibracja metody LA-ICP-MS oraz oznaczanie i mapowanie rozmieszczenia wybranych pierwiastków w niejednorodnych próbkach ciał stałych. Dlatego działalność naukowa Pani mgr Natalii Łucji Miliszkievicz tak dobrze wpisuje się w nurt badań prowadzonych w tej grupie naukowej, na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

**Struktura recenzowanej pracy doktorskiej** jest klasyczna, z zachowaniem tradycyjnego podziału na część teoretyczną (4 rozdziały, 74 strony) i eksperymentalną (4 rozdziały + podsumowanie, 89 stron). Pracy towarzyszy bogata bibliografia obejmująca 305 pozycji literaturowych. Praca zakończona została streszczeniami w języku polskim i angielskim oraz życiorysem naukowym Doktorantki, z którego wynika, że jest ona współautorką 5 publikacji (w tym jednej popularno-naukowej) i współautorką jednego rozdziału w monografii poświęconej analizie przepływowej. Lista wystąpień konferencyjnych obejmuje 4 wystąpienia na konferencjach krajowych i 4 na konferencjach międzynarodowych. Ponadto, pani mgr Natalia Łucja Miliszkievicz brała udział w projektach naukowych, w których pełniła rolę głównego wykonawcy i uczestniczyła w szeregu dodatkowych aktywności szkoleniowych i popularyzatorskich. W 2016 r. otrzymała nagrodę za najlepszy plakat na konferencji European Symposium on Atomic Spectrometry ESAS 2016, przyznaną przez Hungarian Spectrochemical Association.



W części teoretycznej pracy znajduje się szeroki opis metody LA-ICP-MS uwzględniający jej rozwój od momentu wydania pierwszej publikacji na ten temat. Chciałabym podkreślić, że w części literaturowej Doktorantka równolegle poprowadziła wątki opisu rozwoju aparaturowego i metodologicznego, pokazując w jaki sposób znajomość i zrozumienie fizykochemicznych procesów obecnych na każdym etapie prowadzenia analizy z zastosowaniem metody LA-ICP-MS odciskała swój ślad na zmienności proponowanych scenariuszy badawczych. Wybrane, przykładowe, opisy badań poprzedzone zostały dyskusją wybranych podejść kalibracyjnych. Wśród klasycznych podejść do tego zagadnienia, znajdziemy także podrozdział poświęcony metodzie rozcieńczeń izotopowych, która pojawia się jako jedno z najbardziej atrakcyjnych narzędzi analitycznych w ostatnich latach i nadal stosowana jest jedynie w niewielkiej grupie, wysoko wyspecjalizowanych laboratoriów.

Za bardzo interesujący uważam rozdział poświęcony perspektywom i kierunkom rozwoju metody LA-ICP-MS, w którym Doktorantka zaprezentowała swoje zdanie na temat tego, jakie obecnie są najczęściej proponowane rozwiązania aparaturowe, jakie sposoby prowadzenia badań pozwalają już teraz znakomicie wykorzystywać potencjał tej nowoczesnej metody i czego jeszcze możemy oczekiwać w najbliższych latach. Swoje badania ułożyła w najbardziej obiecującym kierunku rozwoju metody LA-ICP-MS, wskazując na rosnące z każdym rokiem znaczenie aplikacyjne tej metody w badaniach biomedycznych, związanych z mapowaniem rozmieszczenia wybranych pierwiastków w próbkach biologicznych.

**Opis badań:** na stronie 73 wymienione zostały dwa cele badań opisanych w pracy doktorskiej mgr Natalii Łucji Miliszkiewicz. Moim zdaniem cel pierwszy, czyli zoptymalizowanie parametrów pracy układu LA-ICP-(TOF)MS, jest wprawdzie istotny z punktu widzenia poprawności analitycznej, jednak można go uznać raczej za etap wstępny prawdziwego działania naukowego, zmierzającego do opracowania metodyki kalibracyjnej z wykorzystaniem wzorców o dopasowanej matrycy do matrycy próbek szczurzych tkanek mózgu i ludzkich kości.

Poszczególne kroki optymalizacji warunków pracy układu pomiarowego zostały przeprowadzone prawidłowo, Doktorantka opisała szczegółowo kolejność działań i udokumentowała zmienną czułość pomiarów, wywołaną zmianami optymalizowanych parametrów, wśród których uwzględniła między innymi:

- ograniczenie objętości wewnętrznej komory do ablacji laserowej za pomocą specjalnej, dedykowanej nakładki;

- zmianę gazu nośnego z argonu na hel;

- dobór parametrów pracy lasera oraz ustawienia spektrometru mas.

Ostateczna optymalizacja warunków pomiarowych zakończona została w wyniku wykorzystania planu kompozycyjnego, włączając wybrane zmienne zależne. Propozycja optymalizacji warunków pomiaru z wykorzystaniem metod planowania eksperymentu, przy możliwości wyboru tak ograniczonych wartości poszczególnych parametrów pracy lasera i spektrometru mas nie jest dla mnie jasna. Będę wdzięczna za komentarz tej kwestii i porównanie ewentualnych różnic, jakie mogły się pojawić, gdyby wyboru



poszczególnych parametrów dokonać wprost z danych umieszczonych na wykresach: 4A i 4B (str.104), 8A i 8B (str.109), 9 (str.111) oraz wykresu 10A i 10B (str.113).

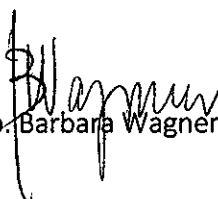
Tabela 17 (str.112) zawiera informacje na temat parametru, którego wartości dostępne są pomiarowi aparaturowemu. Doktorantka zdecydowała się na przeprowadzenie obliczeń kontrolnych, których wynik nie odbiega znacząco od wartości zmierzonych. Sądzę, że można było krótko wspomnieć o tym fakcie bez tabelaryzowania uzyskanych informacji numerycznych, tym bardziej, że sama Autorka zauważa (str. 111) iluzoryczną przydatność tego parametru podczas świadomej kontroli warunków ablacji. Wartość podawanego parametru wynika z doboru energii wiązki lasera doprowadzonej na powierzchnię próbki w obszarze o zdefiniowanej średnicy, a zatem stanowi wartość wtórną względem tych parametrów, na które może mieć rzeczywisty wpływ osoba prowadząca mikropróbki. Celowo unikałam do tej pory nazwy tego parametru, który pojawia się wielokrotnie w recenzowanej pracy jako „*fluencja*”, gdyż moim zdaniem lepiej byłoby stosować w tych miejscach termin: „*gęstości energii*”. Zdaję sobie sprawę z tego, że dyskusja na temat wielu terminów stosowanych w chemii analitycznej ma szeroki zasięg i nie zawsze możliwe jest osiągnięcie kompromisu, lub ugody w kwestii poprawności wszystkich kontrowersyjnych określeń, jakich potrzebujemy do opisu prowadzonych działań naukowych. Pozwolę sobie jednak zwrócić uwagę na kilka takich kontrowersji językowych, które były dla mnie, jako recenzenta, drażniące: „*abundacja*” zamiast „*naturalnej zawartości pierwiastka w przyrodzie*”; „*saturation*” dla określenia „*nasylenia*” (sygnału); „*dotowanie*” próbek, jako ich „*wzbogacenie*” w wybrany pierwiastek, lub choćby „*materiały referencyjne*” zamiast „*materiałów odniesienia*” albo „*dystrybucja*” zamiast „*rozmoszczenia*” pierwiastków w badanej tkance. Są to jednak kwestie językowe, które w żadnym stopniu nie zmniejszają pozytywnej oceny ogólnego wydzwiku naukowego recenzowanej rozprawy doktorskiej.

Praca doktorska pani mgr Natalii Łucji Miliszkievicz zawiera opis szeregu podjętych systematycznych działań analitycznych, z których wynika wniosek o konieczności umiarkowanego optymizmu wobec możliwości prowadzenia dokładnych i precyzyjnych oznaczeń stosunków izotopowych Sr ( $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ ) w kościach ludzkich metodą LA-ICP-MS w układzie wykorzystywanym podczas opisanych badań. Natomiast prowadzone w ramach realizowanej pracy doktorskiej badania pozwoliły na zaproponowanie nowatorskiego sposobu kalibracji dla dwóch wybranych pierwiastków Mg i Zn, których zawartości stanowiły cel badań tkanek mózgowych szczurzych. Doktorantka sprawdziła wpływ sposobu utrwalania i przechowywania wzorców na ich jednorodność i przydatność w badaniach ilościowych prowadzonych metodą LA-ICP-MS. Tę część pracy oceniam jako najbardziej wartościową i posiadającą wysoki potencjał aplikacyjny dla dalszych badań biologicznych. Jako rekomendowaną procedurę do takich badań Doktorantka wskazała przygotowanie wzorców na bazie tkanek liofilizowanych i podała zalecenie podobnego przygotowania próbek do analiz. Zaprezentowane w Tabeli 30 wyniki walidacji procedury oznaczania Mg i Zn w tkance mózgowej szczura metodą LA-ICP-MS pozwalają na pozytywną ocenę zaproponowanego scenariusza badania tkankowych preparatów, który został wykorzystany podczas badań opisanych w dalszej części pracy doktorskiej. Średnie zawartości Mg i Zn oznaczone w wybranych próbkach tkanek szczurów analizowane były w postaci mineralizatów metodą ICP-MS, lub w



postaci preparatów tkankowych - metodą LA-ICP-MS. Wyniki tych oznaczeń nie różniły się znacząco, natomiast mapowanie rozmieszczenia dwóch, wybranych pierwiastków (Mg, Zn) pozwoliło na porównanie jednorodności próbek tkanek mózgu pobranych ze zwierząt z dwóch różnych grup eksperymentu biologicznego.

Pomimo pewnych uwag (głównie dotyczących poprawek językowych i edytorskich), pozytywnie oceniam pracę doktorską pani mgr Natalii Łucji Miliszkiewicz pod tytułem "*Kalibracja oznaczeń techniką spektrometrii mas z mikropróbkowaniem laserowym i jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (LA-ICP-MS)*" i stwierdzam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 13 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. zm.). Dlatego przedkładam wniosek do Rady Naukowej Wydział Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie mgr Natalii Łucji Miliszkiewicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

  
dr hab. Barbara Wagner