

Białystok, 28 listopada 2017 r.

Prof. dr hab. Anatol Kojło  
Uniwersytet w Białymstoku  
Instytut Chemii  
ul. K. Ciołkowskiego 1K  
15-245 Białystok

**RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ MGR PAWŁA ŚWITA  
pt. „BADANIE I ELIMINACJA EFEKTÓW INTERFERENCYJNYCH  
Z ZASTOSOWANIEM INNOWACYJNYCH METOD KALIBRACYJNYCH”**

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr Pawła Świta pt. „Badanie i eliminacja efektów interferencyjnych z zastosowaniem innowacyjnych metod kalibracyjnych” wykonana została w Zakładzie Chemii Analitycznej na Wydziale Chemii UJ pod kierunkiem prof. dr hab. Pawła Kościelniaka. Jest ona kontynuacją prac badawczych prowadzonych w zespole Pana Profesora, który jako jeden z nielicznych w kraju, tak dogłębnie i to zarówno od strony teoretycznej jak i praktycznej zajmuje się problemami kalibracji w analizie chemicznej. Doktorant za cele swoich badań przyjął doskonalenie metod kalibracji wcześniej opracowanych w zespole oraz opracowanie nowych, oryginalnych rozwiązań, które pozwolą na wykrywanie, eliminowanie bądź minimalizowanie efektów interferencyjnych, co w konsekwencji prowadzi do osiągnięcia lepszej dokładności metod analitycznych. Doktorant przeprowadził badania teoretyczne oraz modelował różne sytuacje analityczne, które później weryfikował badaniami eksperymentalnymi. Badania te dotyczyły zintegrowanej metody kalibracyjnej (ICM), uogólnionej strategii kalibracyjnej (GCS), uogólnionej strategii kalibracyjnej w wersji dwuskładnikowej (2C-GCS), metody dodatku wzorca punktu H w wersji chemicznej (C-HPSAM) oraz połączenia zintegrowanej metody kalibracyjnej i metody dodatków wzorca punktu H ((ICM/HPSAM).

Rozprawa ma klasyczny układ i została podzielona na część literaturową i badania własne. Całość składa się z 17 rozdziałów poprzedzonych streszczeniem w języku polskim i angielskim. Pierwszy z nich stanowi wstęp, a kolejnych osiem (rozdz. 2 - 9) to przegląd literatury będący wprowadzeniem do zagadnień, które były przedmiotem przeprowadzonych badań. W rozdziałach 10 i 11 doktorant przedstawia cel, plan badań oraz ich metodykę. Kolejne rozdziały (12-16) poświęcone są omówieniu wyników badań związanych z zaproponowanymi procedurami kalibracyjnymi - są to badania teoretyczne i modelowe, potwierdzane następnie praktycznie z wykorzystaniem układów przepływowych, skonstruowanych przez doktoranta, do ich realizacji. Recenzowaną rozprawę zamyka

podsumowanie wraz z wnioskami oraz spis tabel, rysunków i cytowanej literatury. Całość została przedstawiona na 197 stronach tekstu ilustrowanego licznymi tabelami (27) i rysunkami (82). W przeglądzie literatury autor odwołuje się do 71 prac naukowych, wśród których 24 to prace zespołu prof. P. Kościelniaka. Świadczy to o ogromnym wkładzie tego zespołu w rozwój tej, tak ważnej dla analizy chemicznej, problematyki badawczej.

Dobór źródeł literaturowych i układ treści omawianych w części literaturowej uważam za bardzo trafny. Doktorant kolejno przybliży czytelnikowi zagadnienia bezpośrednio związane z badaniami przeprowadzonymi w ramach rozprawy. Zaczyna od przytoczenia definicji kalibracji analitycznej wskazując na jej miejsce i rolę w procesie analitycznym. Następnie wymienia rodzaje efektów interferencyjnych omawiając ich wpływ na dokładność wyniku analitycznego. Wskazuje przy tym na możliwości wyeliminowania ich wpływu poprzez zastosowanie odpowiedniej procedury kalibracyjnej. Najważniejsze w tej części rozprawy są rozdziały 5 - 8, w których doktorant omówił szczegółowo trzy procedury kalibracyjne, które są podstawą wszystkich badań przeprowadzonych przez doktoranta: zintegrowaną metodę kalibracyjną, uogólnioną strategię kalibracyjną oraz metodę dodatku wzorca punktu H. Ostatni rozdział części literaturowej to omówienie trzech innych procedur kalibracyjnych, które pojawiły się w literaturze naukowej w ostatnich latach. Uważam, że dobór i zakres zagadnień omówionych w części literaturowej jest wystarczający na potrzeby niniejszej rozprawy.

W rozdziałach (12-16) przedstawione są wyniki badań i ich interpretacja. Każdy z tych rozdziałów poświęcony jest kolejnej procedurze kalibracyjnej i ma podobny układ: najpierw doktorant przedstawia przyjęte założenia, następnie przystępuje do opisu badań teoretycznych i modelowych polegających na wyprowadzeniu odpowiednich wzorów i ich interpretacji, dalej opisuje bazę doświadczalną niezbędną do przeprowadzenia wybranych oznaczeń z zastosowaniem badanej procedury kalibracyjnej, opisuje układ przepływowy pozwalający na sprawne jej przeprowadzenie, przedstawia wyniki oznaczeń, przeprowadza ich dogłębną analizę konfrontując z badaniami modelowymi i kończy podsumowaniem oraz wnioskami. Rozdziały te zawierają liczne tabele i rysunki i w sposób bardzo przejrzysty i logiczny ilustrują kolejne etapy badań.

Pierwsza część badań własnych dotyczyła zintegrowanej metody kalibracyjnej w wersji metody wzajemnych rozcieńczeń, opisaną dokładnie w rozdziale 5, w części literaturowej rozprawy. W metodzie tej rejestruje się siedem sygnałów, dla odpowiednio sporządzonych roztworów próbki i wzorca, które są podstawą utworzenia wykresów kalibracyjnych. Na ich podstawie wyznacza się i oblicza zestaw sześciu stężeń pozornych uzyskanych na drodze

interpolacyjnej, pół-ekstrapolacyjnej oraz ekstrapolacyjnej, które są oszacowaniem stężenia analitu w próbce. Ze względu na różny sposób ich obliczania są one obarczone w różnym stopniu błędem przypadkowym, co nie pozwala na statystyczne ich porównanie. Dlatego, aby takie porównanie było możliwe, doktorant w badaniach modelowych wprowadził do równań opisujących błędy przypadkowe, którymi obarczone są stężenia pozorne wyznaczone na drodze pół-ekstrapolacyjnej i ekstrapolacyjnej, odpowiednie współczynniki korekcyjne. Rozważania modelowe pozwoliły doktorantowi na zaproponowanie schematu postępowania przy ocenie statystycznej stężeń pozornych, który zastosowano następnie i potwierdzono jego użyteczność w badaniach doświadczalnych.

Następną procedurą kalibracyjną, którą zajął się doktorant była uogólniona strategia kalibracyjna (GCS) polegająca na rejestrowaniu sygnałów analitycznych dla stopniowo rozcieńczanych roztworów, przygotowywanych zgodnie z zasadą zintegrowanej metody kalibracyjnej. W tym przypadku badania modelowe polegały na wykorzystaniu do opisu sześciu rejestrowanych sygnałów analitycznych ogólnego wzoru określającego ich zależność od stężenia analitu i uwzględniającego obecność interferentów w rozważanej próbce. Wzór ten uwzględniał także charakter funkcyjny, jaki może przybierać wykres kalibracyjny i różny charakter efektu interferencyjnego. Posługując się tym modelem obliczano zestawy sześciu wartości stężeń pozornych na każdym etapie rozcieńczenia badając jednocześnie, w jakim stopniu dążą one w miarę postępu rozcieńczenia do oczekiwanej wartości stężenia analitu. Badania modelowe zostały przedstawione w postaci 15 wykresów pokazujących bardzo przejrzyste zmienność stężeń pozornych wyznaczanych na drodze interpolacyjnej i ekstrapolacyjnej dla różnych założonych sytuacji analitycznych – przy założeniu zarówno liniowej jak i nieliniowej zależności sygnału od stężenia w nieobecności interferencji oraz od obecności rozmaitych efektów interferencyjnych: addytywnych, multiplikatywnych, zależnych hiperbolicznie od stężenia interferentów i liniowo lub hiperbolicznie od stężenia analitu.

*W badaniach modelowych związanych z zintegrowaną metodą kalibracji doktorant wprowadził współczynniki korekcyjności błędów przypadkowych stężeń pozornych uzyskanych na drodze pół-ekstrapolacyjnej i ekstrapolacyjnej po to, aby możliwe było statystyczne porównanie wszystkich oszacowań wyniku analitycznego. Czy porównanie statystyczne stężeń pozornych w uogólnionej strategii kalibracyjnej (GCS) i innych metodach kalibracji, w których uzyskuje się je interpolacyjnie, pół-ekstrapolacyjnie i ekstrapolacyjnie nie wymaga także wprowadzenia analogicznych współczynników korekcyjności?*

*Na str. 116 tego rozdziału we wnioskach doktorant napisał: „W przypadkach wątpliwych należy procedurę GCS powtórzyć w bardziej sprzyjających warunkach doświadczalnych...” - jak te warunki ustalić?*

W kolejnym etapie badań doktorant zmodyfikował uogólnioną strategię kalibracyjną (GCS) do jednoczesnego oznaczania dwóch składników (2C-GCS). Ta strategia wymaga przygotowania 10 roztworów zawierających cztery składniki: próbkę, wzorce składników A i B oraz rozcieńczalnik, które występują w roztworach kalibracyjnych w różnych kombinacjach, zgodnie ze strategią GCS. Dla każdego sporządzonego roztworu rejestruje się sygnał analityczny w dwóch różnych warunkach, np. przy dwóch długościach fali, charakterystycznych dla obu oznaczanych składników. Zmierzone sygnały pozwalają na skonstruowanie ośmiu dwupunktowych wykresów kalibracyjnych dla każdej długości fali, na podstawie których wyznacza się serię dwunastu stężeń pozornych będących oszacowaniami stężenia składników A i B w próbce (po 4 oszacowania ekstrapolacyjne, pół-ekstrapolacyjne i interpolacyjne). Podobnie jak w metodzie GCS przeprowadza się proces stopniowego rozcieńczania roztworów kalibracyjnych wyznaczając dla kolejnych jego stopni stężenia pozorne, poddawane następnie ocenie statystycznej i interpretowane podobnie jak w metodzie GCS. Zakładając w badaniach modelowych, że drugi składnik jest odpowiedzialny za addytywny efekt interferencyjny doktorant wykazał, analizując wzory opisujące poszczególne sygnały, że metoda kalibracji w wersji 2C-GCS może być skuteczna w jego eliminacji.

Następną metodą kalibracji zaproponowaną przez doktoranta jest chemiczna metoda dodatku wzorca punktu H (C-HPSAM), wzorowana na metodzie dodatku wzorca punktu H (HPSAM) opisaną w literaturze i polegającej na wykonaniu kalibracji metodą dodatku wzorca w dwóch różnych warunkach instrumentalnych (np. przy dwóch długościach fali). W wersji doktoranta kalibrację taką przeprowadza się w różnych warunkach chemicznych (np. przy różnych wartościach pH). Otrzymuje się wtedy dwa wykresy kalibracyjne o różnym nachyleniu przecinające się, po ich ekstrapolacji do zerowej wartości sygnału analitycznego, w punkcie H, co pozwala na oszacowanie wyniku analitycznego wolnego od efektu interferencyjnego o charakterze addytywnym. Badania modelowe w tej części pracy polegały na wyprowadzeniu wzorów pozwalających na obliczenie stężenia analitu i wartości efektu addytywnego. *Wydaje się, że największym problemem w szerszym stosowaniu procedury kalibracyjnej C-HPSAM może być znalezienie warunków spełniających jej założenia w odniesieniu do danej metody analitycznej. Czy można zatem powiedzieć, że jest to procedura o dużej uniwersalności?*

Za największe swoje osiągnięcie doktorant uważa połączenie zintegrowanej metody kalibracyjnej (ICM) z metodą dodatków wzorca punktu H (HPSAM) w pojedynczą procedurę kalibracyjną (ICM/HPSAM). Ten sposób postępowania pozwala na wykrycie i eliminację efektów interferencyjnych o charakterze multiplikatywnym i addytywnym w jednej procedurze kalibracyjnej. W badaniach teoretycznych doktorant omówił wykresy kalibracyjne otrzymywane w tej procedurze i opisał za pomocą odpowiednich wzorów zestaw oszacowań wyników analitycznych oraz błędy powodowane występowaniem efektów interferencyjnych. Badania modelowe dotyczyły symulacji występowania efektów interferencyjnych w kontekście oceny dokładności wyników analitycznych uzyskiwaną tą metodą kalibracji.

W badaniach doświadczalnych doktorant weryfikował wnioski wynikające z badań teoretycznych i modelowych, a korzystając z najnowszych rozwiązań aparaturowych z zakresu technik przepływowych konstruował układy przepływowe pozwalające na przygotowanie odpowiedniego, dla danej metody kalibracji, zestawu roztworów kalibracyjnych. Układy te łączył następnie z układami pomiarowymi do oznaczania wybranych analitów, co pozwalało na wyznaczenie wykresów kalibracyjnych i oznaczenie badanego składnika.

W przypadku zintegrowanej metody kalibracyjnej (ICM) został zaprojektowany nowy multikomutacyjny układ przepływowy sterowany komputerowo, umożliwiający sprawne przygotowanie niezbędnych w tej metodzie roztworów kalibracyjnych. Układ ten został następnie sprawdzony w spektrofotometrycznym oznaczaniu chrom(III) i oznaczaniu selenu techniką atomowej spektrometrii fluorescencyjnej z generowaniem wodorków. W obu przypadkach układ do generowania roztworów kalibracyjnych łączono bezpośrednio z odpowiednim układem detekcyjnym. W tak skonstruowanych układach pomiarowych oznaczano chrom i selen w próbkach syntetycznych a także selen w obecności miedzi, jako interferenta oraz w próbkach naturalnych: w tabletkach selenu drożdżowego, witaminie E, napoju energetycznym wzbogaconym w selen, wodach termalnych. Otrzymane wyniki oznaczeń oraz sposób ich interpretacji wypracowany w badaniach modelowych potwierdziły skuteczność działania zintegrowanej metody kalibracyjnej i poprawność działania zbudowanego do jej realizacji układu przepływowego.

Do realizacji uogólnionej strategii kalibracji (GCS) doktorant skonstruował sterowany komputerowo układ przepływowy zbudowany z mikropomp solenoidowych, trójdrożnych zaworów elektromagnetycznych i pompy perystaltycznej. Istotnym elementem tego układu było specjalnie skonstruowane naczynko zapewniające efektywne mieszanie roztworów kalibracyjnych. Układ ten po połączeniu ze spektrometrem absorpcji atomowej zastosowano

do oznaczania wapnia w próbkach syntetycznych bez interferenta, w certyfikowanym materiale odniesienia mleka w proszku, w próbkach mleka w proszku Bebilon oraz w próbkach sera „oscypek”. Uzyskane wyniki oznaczeń wykazały skuteczność działania układu przepływowego przeznaczonego do sporządzania roztworów kalibracyjnych oraz potwierdziły założenie, że zastosowanie metody GCS z reguły pozwala na uzyskanie wyników dokładniejszych niż w przypadku zastosowania tradycyjnego postępowania kalibracyjnego.

Do praktycznej realizacji metody 2C-GCS zastosowano sterowany komputerowo układ przepływowy wykorzystujący technikę sekwencyjnej analizy przepływowej (SIA). Na przykładzie spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny i paracetamolu wykazano, że stosując kalibrację metodą 2C-GCS można wyeliminować efekt interferencyjny o charakterze addytywnym, co jest równoznaczne z możliwością oznaczenia obu analitów jednocześnie. Przydatność tej metody kalibracji sprawdzono także oznaczając kofeinę i paracetamol w próbkach rzeczywistych - w trzech różnych preparatach farmaceutycznych. Jednocześnie otrzymane wyniki oznaczeń porównano z wynikami otrzymanymi z wykorzystaniem kalibracji innymi metodami: GCS, SSM i SAM.

Skuteczność kalibracji z zastosowaniem procedury C-HPSAM sprawdzono w spektrofotometrycznych oznaczeniach kwasu askorbinowego, na podstawie pomiaru absorbancji kompleksu Fe(II)-o-fenantrolina, oraz kwasowości całkowitej win. Kwas askorbinowy oznaczano w próbkach syntetycznych, syntetycznych z dodatkiem barwnika spożywczego oraz w napojach i syropach. Kalibrację zgodną z procedurą C-HPSAM wykonano w układzie przepływowym stosując technikę wstrzykowo-sekwencyjną z wykorzystaniem modułu Lab-on-valve (LOV). Kwasowość całkowitą win oznaczono także spektrofotometrycznie, jednak w odmiennym wstrzykowo-przepływowym układzie pomiarowym sterowanym komputerowo. W odniesieniu do przeprowadzonych oznaczeń potwierdziły się założone w badaniach modelowych korzyści płynące z zastosowania tej procedury kalibracyjnej. *Do przeprowadzenia procedury kalibracji metodą C-HPSAM w przykładowych oznaczeniach zastosowano dwa różne układy przepływowe, w których sporządzano roztwory kalibracyjne - czy zastosowanie tej procedury w różnych metodach analitycznych będzie wymagało każdorazowo skonstruowania innego instrumentu do jej realizacji?*

Możliwości procedury kalibracyjnej ICM/HPSAM zostały sprawdzone i potwierdzone w spektrofotometrycznym oznaczaniu wapnia na podstawie reakcji z Arsenazo III w próbkach syntetycznych oraz w próbkach wód mineralnych. *W oznaczeniu tym roztwory kalibracyjne*

przygotowywano manualnie. Dlaczego nie zastosowano w tym przypadku usprawnienia w postaci podobnych do poprzednio stosowanych układów przepływowych? Nasuwa się także pytanie związane z dużą różnorodnością zaprojektowanych przez doktoranta układów przepływowych. Sposób przygotowywania roztworów kalibracyjnych w poszczególnych procedurach proponowanych przez doktoranta jest bardzo podobny - czy możliwe jest zatem zbudowanie uniwersalnego układu przepływowego, wspólnego dla wszystkich procedur, który można byłoby dołączać do układów analitycznych do oznaczania różnych analitów?

W trakcie czytania pracy zauważyłem także pewne nieścisłości w tekście: str. 108 – na rysunku 13.16 nie zaznaczono zaworu  $V_1$ ; str. 112 – wynik końcowy w tabeli 13.2 został policzony jako średnia z czterech stężeń ( $c_3$ ,  $c_4$ ,  $c_5$ ,  $c_6$ ), a nie z sześciu, jak podano w tekście; str. 111 – w tekście podano, że błąd względny nie przekracza 0,5%, co nie jest zgodne z danymi podanymi w tabeli 13.2; str. 118 - na rysunku 14.2 zamieniono sygnał  $R_2(\lambda_1)$  z sygnałem  $R_5(\lambda_1)$  oraz sygnał  $R_8(\lambda_2)$  z sygnałem  $R_9(\lambda_2)$ . Dostrzegłem również nieliczne potknięcia językowe, ale nie miały one większego wpływu na moją ocenę rozprawy.

Podsumowując - przedstawioną do recenzji rozprawę doktorską oceniam bardzo wysoko. Została przygotowana starannie edytorsko, technicznie i poprawnie językowo. Opisane w rozprawie badania zostały bardzo dobrze zaplanowane i poprawnie wykonane pod względem metodycznym, a założone cele osiągnięto. Opracowane procedury kalibracyjne i sposoby ich realizacji są oryginalne i jak wykazał doktorant przewyższają często pod względem dokładności uzyskiwanych wyników tradycyjne metody kalibracyjne, powinny więc znaleźć zastosowanie w praktyce laboratoryjnej - świadczą o tym liczne przykłady oznaczeń analitycznych, które doktorant przeprowadził w trakcie swoich badań. Na uwagę zasługują także osiągnięcia publikacyjne doktoranta, związane z przeprowadzonymi w ramach rozprawy badaniami. Jest on współautorem czterech prac opublikowanych w wiodących międzynarodowych czasopismach analitycznych takich, jak Analytical Methods, Talanta i Analytical Letters. Wskazuje to na ważność podjętych badań i ich nowatorskość. Stwierdzam, że recenzowana przeze mnie rozprawa mgr Pawła Świta spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 r., (Dz. Ustaw Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję do Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anatol Ustul