



Dr hab. Zofia Kowalewska, prof. PW

tel. 24 3672137, tel. kom. 604569041

email: zofia.kowalewska@pw.edu.pl; zofia.kowalewska@gmail.com

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Pawła Świta

pt. Badanie i eliminacja efektów interferencyjnych z zastosowaniem innowacyjnych metod kalibracyjnych

Każdego dnia na świecie wykonywana jest ogromna liczba analiz, których wyniki są podstawą decyzji dotyczących życia i zdrowia człowieka, stanu środowiska naturalnego, bezpieczeństwa i efektywności produkcji. Prawidłowość podejmowanych decyzji zależy od miarodajności wyników analitycznych. Co więcej, obecne, wysokie oczekiwania w stosunku do chemii analitycznej z całą pewnością wkrótce staną się niewystarczające, ponieważ następuje gwałtowny wzrost produkcji nowych substancji chemicznych, pojawiają się lub są ujawniane nowe zagrożenia, zwiększa się konieczność wykonywania oznaczeń w złożonych materiałach i na coraz niższych poziomach zawartości analitów.

Aby sprostać istniejącym i wciąż zwiększającym się wymaganiom konieczne jest opracowywanie i rozwijanie nowych narzędzi. Większość metod analitycznych to metody względne, dlatego duże znaczenie mają stosowane metody kalibracji analitycznej. W trend rozwijania nowych narzędzi kalibracyjnych wpisuje się rozprawa doktorska Pana magistra Pawła Świta, zatytułowana *Badanie i eliminacja efektów interferencyjnych z zastosowaniem innowacyjnych metod kalibracyjnych*. Praca została wykonana w Zespole Analitycznych Techniek Przepływowych Zakładu Chemii Analitycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod opieką Promotora, prof. dr hab. Pawła Kościelniaka, oraz Promotora pomocniczego, dr Marcina Wieczorka. Opracowywanie i rozwój zaawansowanych metod kalibracyjnych to jeden z wiodących kierunków prac naukowych realizowanych w zespole Promotora pracy, co od lat znajduje uznanie w nauce światowej.

Przedłożona do oceny rozprawa doktorska została przedstawiona w formie jednolitego tekstu, mimo wcześniejszego opublikowania wyników w czasopismach naukowych. Praca liczy 197 stron, zawiera 27 tabel i jest zilustrowana 82-oma rysunkami. Właściwa rozprawa jest poprzedzona streszczeniami w języku polskim i angielskim, za którymi zamieszczono *Spis treści*.

Część literaturową (47 stron) rozpoczyna *Wstęp*, w którym przedstawiono uzasadnienie i koncepcję pracy. W kolejnych rozdziałach *Kalibracja analityczna* i *Efekty interferencyjne* wprowadzono definicje podstawowych pojęć używanych w rozprawie oraz ogólny podział interferencji. Następny rozdział poświęcony jest tradycyjnym metodom kalibracyjnym. Oddzielne rozdziały poświęcono metodom kalibracyjnym badanym w ocenianej pracy, opracowanym w zespole Promotora doktoratu. Część literaturową kończy rozdział *Inne podejścia kalibracyjne*.

Druga część pracy, zatytułowana *Badania własne* liczy 120 stron. Zaczynają ją rozdziały wstępne *Cel badań* i *Metodyka badań*. Właściwa część doświadczalna rozprawy to 5 rozdziałów (o numerach 12-16). Poszczególne rozdziały poświęcone są poszczególnym problemom badawczym, opisanym w już opublikowanych pracach Doktoranta (rozdziały 12-15) lub w pracy zaakceptowanej do druku (rozdział 16). Każdy z wymienionych 5-ciu rozdziałów składa się z podrozdziałów przedstawiających badania modelowe lub badania teoretyczne i modelowe, bazę doświadczalną i układ pomiarowy, wyniki i dyskusję oraz podsumowanie i wnioski. Każdorazowo badania rozpoczynają analizy próbek syntetycznych (proste roztwory wzorców), a kolejny etap to badania próbek rzeczywistych.

Rozdział 12 jest poświęcony zintegrowanej metodzie kalibracyjnej, ICM, która została zastosowana do oznaczania selenu techniką HG-AFS (publikacja: M. Wieczorek, P. Kościelniak, P. Świt, K. Marszałek, *Anal. Methods*, 6, 2014, 9276). Specjalnie opracowany multikomutacyjny układ przepływowy był wstępnie sprawdzony na przykładzie oznaczeń chromu techniką spektrofotometryczną UV/VIS. Selen oznaczano w próbkach syntetycznych nie zawierających interferentów, w próbkach syntetycznych zawierających miedź, i próbkach rzeczywistych o różnej matrycy.

Rozdział 13 dotyczy uogólnionej strategii kalibracyjnej GCS, zastosowanej do oznaczania wapnia techniką FAAS (publikacja: M. Wieczorek, P. Kościelniak, P. Świt, J. Paluch, J. Kozak, *Talanta*, 133, 2015, 21). Dla celów tego zadania został opracowany specjalny układ przepływowy zbudowany z mikropomp solenoidowych. Próbkami rzeczywistymi, w których oznaczano wapń były produkty mleczne. Jednym z wariantów analitycznych były oznaczenia z niewielkim dodatkiem buforu uwalniającego, lantanu.

Uogólnioną strategię kalibracyjną w wersji dwuskładnikowej 2C-GCS (rozdział 14) zastosowano do jednoczesnego oznaczania dwóch analitów, paracetamolu i kofeiny, techniką spektrofotometrii UV/VIS (publikacja: P. Chocholouš, M. Wieczorek, P. Świt, J. Kozak, P. Solich, P. Kościelniak, *Anal. Let.*, 50, 2017, 617). Również tutaj zbudowano specjalny układ przepływowy. Układ ten umożliwiał automatyczne otrzymywanie 10-ciu roztworów koniecznych do wykonania oznaczenia. Silny efekt interferencyjny powodowany przez paracetamol w oznaczeniach kofeiny został wyeliminowany w strategii 2G-GCS, natomiast powodował znaczne zawyżenie wyników analiz w prostszych wariantach kalibracyjnych.

Interesującym rozwiązaniem kalibracyjnym, ze względu na możliwość eliminacji interferencji addytywnych, jest metoda dodatków wzorca punktu H. Metodę tę zastosowano w nietypowym wariacie, C-HPSAM (chemicznym), do oznaczania kwasu askorbinowego (rozdział 15.3) oraz kwasowości całkowitej win (rozdział 15.4). Podstawą metody jest wykonywanie oznaczeń w warunkach zmiennego pH, przy założeniu stałości efektu interferencyjnego we wszystkich warunkach i zmienności (jak największej) sygnału analitu w tych warunkach. W obu badanych przypadkach analitycznych stosowano specjalnie zbudowany układ przepływowo-wstrzykowy i technikę spektrofotometrii UV/VIS. Wyniki badań opublikowano (M. Wieczorek, S. Rengevicova, P. Świt, A. Woźniakiewicz, J. Kozak, P. Kościelniak, *Talanta*, 170, 2017, 165-172).

Ostatni wariant kalibracji (rozdział 16) jest wariantem najbardziej zaawansowanym i najbardziej skutecznym. Jest to połączenie zintegrowanej metody kalibracyjnej i metody dodatków wzorca punktu H, ICM/HPSAM. Metodę tę badano na przykładzie oznaczania wapnia w obecności magnezu techniką spektrofotometrii UV/VIS. Zadaniem metody ICM/HPSAM jest jednocześnie eliminacja efektów interferencyjnych o charakterze multiplikatywnym i addytywnym. Praca została wykonana w ramach współpracy międzynarodowej, jako wynik pobytu Doktoranta w Hiszpanii, który jest tutaj pierwszym autorem publikacji (P. Świt, J. Verdu-Andres, M. Wieczorek, J. Kozak, P. Kościelniak, P. Campins-Falco, *zaakceptowane do druku w Analytical Letters*). Warto odnotowania jest fakt, że jednym ze współautorów publikacji jest prof. Campins-Falco, współautorka pierwszej pracy na świecie poświęconej metodzie HPSAM (opublikowanej w 1988 w czasopiśmie *Analyst*).

Pracę kończy rozdział (17-ty) *Podsumowanie i wnioski końcowe*, za którym zamieszczono kolejno: *Spis tabel*, *Spis rysunków* i *Literaturę*.

Struktura i układ pracy są logiczne. Praca przygotowana jest na dobrym poziomie edytorskim i napisana na ogół poprawnym językiem. Zauważone potknięcia i pomyłki zostaną wymienione w dalszej części Recenzji. Przydatny byłby wykaz akronimów.

Za najważniejsze osiągnięcia ocenianej pracy doktorskiej uważam:

- zaproponowanie i wypróbowanie oryginalnych układów przepływowych, które pozwalają na automatyczne przygotowywanie wielu roztworów potrzebnych do wykonania analiz według zaawansowanych strategii kalibracji,
- wykonanie obliczeń (badania teoretyczne) i symulacji (badania modelowe), które doprowadziły do zaproponowania stosunkowo prostego sposobu wyznaczania wyników analiz (obliczenia w programie Excel) z zastosowaniem zaawansowanych strategii kalibracyjnych,
- wykonanie badań 5-ciu zaawansowanych strategii kalibracyjnych z zastosowaniem próbek rzeczywistych.

W ocenianej pracy doktorskiej zostały zaproponowane nowe narzędzia, które, zgodnie z założeniami Autora, mogą być bardzo pomocne w pracy laboratoryjnej. Nie rekomendowałabym stosowania zaawansowanych metod kalibracyjnych w sytuacjach, w których to nie jest konieczne. Na przykład, w odróżnieniu od Autora pracy zdecydowanie pozostałabym przy korygowaniu interferencji chemicznych w FAAS poprzez stosowanie odpowiednich buforów, wszędzie tam, gdzie takie bufory zostały opracowane i są skuteczne. Natomiast, przy opracowywaniu i walidacji nowych metod analitycznych zdarzają się sytuacje ograniczonej możliwości weryfikacji dokładności i poprawności analiz. Tak jest w wielu przypadkach analiz materiałów nietypowych czy analiz w przemyśle, gdzie badaniu trudnych układów towarzyszy całkowity brak certyfikowanych materiałów odniesienia czy badań biegotości. Możliwość diagnostyki interferencji i ich eliminacji jest tu bardzo cenna. Inny potencjalny zakres zastosowań zaawansowanych metod kalibracyjnych to badania w sytuacjach wysokich wymagań dokładności analizy, na przykład przy opracowywaniu materiałów odniesienia.

Autor we *Wstępie* oraz *Podsumowaniu i wnioskach* bardzo surowo ocenia jakość pracy w laboratoriach, cytując przy tym tylko jedną pozycję literaturową i to z 1988 roku. Od tego czasu wraz z rozwojem systemu akredytacji na pewno praktyka laboratoryjna uległa znacznej poprawie. Nie możemy pisać, że „występują błędy w stosowaniu najpopularniejszych metod kalibracyjnych”. Prawdopodobnie w zdecydowanej większości przypadków metody kalibracyjne są stosowane właściwie (zgodnie z założeniami), chociaż mogą być nieskuteczne. Natomiast zgadzam się, że wśród wielu działań walidacyjnych wciąż zbyt mała uwaga jest przykładana do badania dokładności/poprawności, co dotyczy nie tylko pracy laboratoriów, ale także publikacji naukowych.

Autor ocenił poprzednio stosowane zaawansowane metody kalibracyjne jako zbyt skomplikowane pod względem przygotowania, pomiaru i interpretacji. Nie jest wystarczająco i ilościowo wykazane, co wnoszą metody zaproponowane w rozprawie chociażby z punktu widzenia czasu analizy, ilości odczynników.

Stosowanie zaproponowanych metod wiąże się ze zwiększonym ryzykiem wprowadzenia zanieczyszczeń, występowania efektów pamięciowych. Metody obejmujące rozcieńczanie próbek mają ograniczone zastosowanie w analizie śladowej. Te zagadnienia nie były dyskutowane ani nawet wspomniane w rozprawie.

Brak syntetycznej oceny i zarysowania perspektyw, do jakich technik analitycznych mogą być wykorzystane przebadane metody kalibracyjne.

Wydaje się, że droga do upowszechnienia zaawansowanych metod kalibracyjnych jest długa i powinna prowadzić przez kolejne badania trudnych układów analitycznych. Podczas analiz próbek rzeczywistych możemy, bowiem, mieć do czynienia z nakładaniem się efektów interferencyjnych o różnym charakterze i nakładaniem się efektów pochodzących od wielu interferentów. Jest tutaj wiele miejsca na kolejne innowacje.

Uwagi ogólne do Części literaturowej

Autor w rozprawie odnosi się do 71 pozycji literaturowych, z czego 68% to prace opublikowane od 2000 roku, a 38% to prace opublikowane od roku 2010, co świadczy o aktualności tematyki. Spośród cytowanych pozycji 27 (38%) to prace wykonane w zespole Promotora. Chociaż jest zrozumiałe, że największa uwaga musiała być poświęcona metodom kalibracji badanym i rozwijanym przez Doktoranta, rozdział *Inne podejścia kalibracyjne* mógłby być bardziej rozbudowany (np. o bardziej szczegółowe przedstawienie badań prof. L. Pszonickiego). Najlepiej opracowana jest część literaturowa dotycząca metody dodatku wzorca punktu H.

Autor zamieścił w wykazie literatury swoje opublikowane prace, których materiał wchodzi w zakres rozprawy. Ponadto cytuje te prace w części literaturowej, co jest nieprawidłowe i utrudnia ocenę oryginalnego charakteru pracy.

W części literaturowej przydałoby się zestawienie/zestawienia tabelaryczne, na przykład charakteryzujące zakres zastosowań danego podejścia kalibracyjnego.

Uwagi ogólne do Części doświadczalnej

W pracy nie są podane kryteria wyboru poszczególnych przypadków analitycznych. Interferencje mogłyby być dokładniej omówione, wraz z podaniem odpowiedniej literatury, dotyczącej poszczególnych technik analitycznych. Na przykład w oznaczeniach Ca metodą FAAS nie wiadomo, dlaczego matryca produktów mlecznych zaniża wyniki i jak jest rola lantanu.

Mankamentem pracy jest podawanie liczb ze zbyt dużą, z punktu widzenia niepewności pomiaru, liczbą cyfr znaczących.

Duże wątpliwości budzi analiza statystyczna. Autor w wielu oznaczeniach oceniając dokładność wyniku nie podaje/oszacowuje niepewności wartości odniesienia. Taka sytuacja dotyczy nawet certyfikowanego materiału odniesienia. Niepewność wartości odniesienia została wyznaczona (certyfikat jest łatwo dostępny), ale nie została przywołana w pracy doktorskiej. Nie są podane przedziały ufności wyników oznaczeń. Wyliczanie błędów względnych nie jest tu wystarczające. Decyzja o zgodności wyników powinna być podejmowana w oparciu o wyznaczone wartości parametrów stosowanych testów. Testy F-Snedecora i t-Studenta zostały wprawdzie omówione w rozdz. 11-tym *Metodyka badań* (i to zbyt szczegółowo), ale nie były konsekwentnie stosowane. Przy porównywaniu wyników nie zawsze wiadomo, czy są to wyniki pojedynczych pomiarów danego roztworu czy też wyniki pomiarów równoległe przygotowanych roztworów.

Największym mankamentem pracy jest sposób opisu analizy statystycznej w przypadku metody IMC, a szczególnie próba wyliczenia współczynników korygujących błędy przypadkowe. Natura błędów przypadkowych, losowych, powoduje, że nie mogą być skorygowane przez współczynniki czy poprawki.

Biorąc pod uwagę poszczególne strategie kalibracyjne sposób przedstawiania wyników nigdzie nie jest całkowicie satysfakcjonujący, jednak obserwuje się pewną ewolucję w dobrym kierunku i w ostatnich rozdziałach doświadczalnych (metody HPSAM i HCM/HPSAM) analiza statystyczna jest najlepiej wykonana, a przedziały ufności przedstawione.

W kilku przypadkach stosowano metody odniesienia, jednak nie ma informacji, na jakiej podstawie te metody zostały wybrane. Czy są jakieś zalecenia, wymagania urzędowe, zapisy norm przedmiotowych, gdzie procedury odniesienia są wskazane/opisane? Na przykład przy testowaniu metody C-HPSAM na przykładzie oznaczeń kwasu askorbinowego metodą odniesienia jest elektroforeza kapilarna, która nie została bliżej określona (nawet brak odniesienia do literatury), a niepewność oznaczeń jest dla niej bardzo duża (str. 150).

Uwagi szczegółowe

- W pozycjach literaturowych numer 20 i 26 mylnie podano zakres stron.
- Czasami brak konsekwencji w stosowaniu symboli, na przykład rozcieńczalnik jest oznaczany literą „D” lub literą „C”, efekt interferencyjny multiplikatywny jest oznaczany literą „I” lub jako „ME”.
- W schematach przedstawiających skład roztworów kalibracyjnych konsekwentnie byłoby zamieszczać, dodatkowo, rozpuszczalnik „D”. Natomiast w przypadku metod z odnośnikiem (wzorcem) wewnętrznym konieczne jest badanie rozcieńczalnika z dodatkiem odnośnika (wzorca) wewnętrznego (w metodach z wzorcem wewnętrznym wszystkie roztwory pomiarowe powinny zawierać wzorec wewnętrzny), co nie jest uwzględnione na rys. 4.7 ze str. 28.
- Nie jest jednoznaczne, co oznacza dokładnie oznacza symbol „k”. Podane określenie „krotność” jest mylące. Z danych zamieszczonych w pracy wynika, że k przyjmuje wartości 1 lub poniżej jedności, czyli jest w rzeczywistości odwrotnością „krotności”.
- Autor przedstawia rysunki, które są również zamieszczone w jego publikacjach. Najbardziej prawidłowe byłoby każdorazowe cytowanie odnośnika (np. jak na rys. 12.6, str. 83).
- Na str. 36, w pierwszej linijce ostatniego akapitu jest pomyłkowy zapis. Metoda rozcieńczeń *nie* może być zastosowana, jeśli efekt interferencyjny nie zależy od stosunku stężenia analitu i interferenta.
- Str. 44, w części eksperymentalnej pracy określenie ICM jest mylone z CDM. Według informacji podanej w części literaturowej (rozdz. 5) strategia ICM dotyczy badania 4-ech roztworów (opis na str. 38), natomiast metoda CDM, będąca zmodyfikowanym wariantem metody CDM, dotyczy badania 6-ciu roztworów (str. 40). W części literaturowej określenie ICM odnosi się do wariantu 6-cio-roztworowego kalibracji.
- W przypadku testowania metody HPSAM na przykładzie kwasowości win nie została przedstawiona definicja badanej kwasowości. Nie wiadomo, czy uprawnione jest odparowywanie ditlenku węgla przed analizą, co zmienia kwasowość.
- W pracy pojawiają się nieprecyzyjne określenia; na przykład, „wysoki stopień czystości analitycznej”.
- Niezręczności językowe: zamiast „bąble powietrza”, można powiedzieć „pęcherzyki powietrza”.
- Na str. 53 wymienione są metody elektroanalityczne, a nie ma stosownego odnośnika literaturowego (odnośników).
- Na str. 58 pojawia się określenie „analitów oddziaływujących wzajemnie na siebie”; nie jest to najlepsze sformułowanie w stosunku do interferencji addytywnych.
- Na str. 62 pojawia się określenie „przeprowadzone analizy charakteryzują się krótkim czasem i mogą być z powodzeniem zaadoptowane” – nie sprawdzono, dlatego lepsza ostrożność w prognozach.
- Str. 68 Informacja, że „Porównanie stężeń może być tylko wykonane, jeśli nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy zerowej” (chodzi tu o jednorodność wariancji i test F-Snedecora) jest prawdziwa tylko w odniesieniu do testu t-Studenta. Natomiast jeśli wariancje są niejednorodne może być zastosowany inny test np. C-Cochrana i Coxa lub Aspina i Welcha.
- Na str. 69 brak odnośnika literaturowego dotyczącego metody Hahna.
- Str. 80 i generalnie rozdział 12.2: nie ma tu informacji o stopniu utlenienia selenu, a to jest bardzo ważne w metodzie generowania wodorków (tylko Se na stopniu utlenienia IV ulega efektywnej redukcji).
- Rozdz. 12.2.1, nazwy: „azotan(III) chromu”, „azotan chromu (III)” są niewłaściwe (prawdopodobnie chodzi o „azotan(V) chromu (III)”).
- Str. 81 „azotan chromu oznaczano przy..”, nieprecyzyjne określenie, oznaczano „chrom”, a nie „azotan chromu”
- Str. 88, po zdaniu „Świadczy to o braku występowania interfeferencji...” następuje zdanie „Niewielkie błędy przypadkowe i systematyczne wskazują na poprawne skonstruowanie...” Czy błędy systematyczne są, czy ich nie ma?

- Str. 91, nieprecyzyjne określenia „akceptowalna dokładność”, „wyniki zbliżone do siebie”; nie jest to ocena oparta o statystykę.
- Str. 102, nieprecyzyjne określenie: „mogą przyjmować wyłącznie większe wartości od tej wartości (...), ale też większe lub mniejsze od niej (...)”.
- Badania próbek win, str. 157: nie można utlenić SO_3 do H_2SO_4 (prawdopodobnie chodzi o S w postaci SO_2 , a nie SO_3).

Mimo wymienionych w Recenzji mankamentów uważam, że rozprawa doktorska przedstawiona do oceny zawiera oryginalne rozwiązania problemów naukowych, a Doktorant wykazał wiedzę teoretyczną i umiejętność samodzielnego prowadzenia prac badawczych. Wyniki badań zamieszczone w rozprawie zostały opublikowane w wiodących czasopismach analitycznych, a łączny współczynnik oddziaływania (Impact Factor, IF) 5-ciu publikacji jest wysoki i wynosi 12.067 (135 punktów według listy MNiSZW). Ponadto Doktorant jest współautorem dwóch innych publikacji w czasopismach z Listy Filadelfijskiej (łączny IF 1.914, 40 punktów według listy MNiSZW), współautorem pięciu rozdziałów w książkowych pracach zbiorowych w języku polskim i współautorem około 40-tu wystąpień na konferencjach krajowych i międzynarodowych.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pana magistra Pawła Świta spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim, określone w art. 13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dz. U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę o dopuszczenie jej Autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zofia Kowalewska

dr hab. Zofia Kowalewska, prof. PW

Płock, 20 listopada 2017