

prof. dr hab. Michał Daszykowski

Instytut Chemii
Uniwersytet Śląski
ul. Szkolna 9
40-006 Katowice

e-mail: michal.daszykowski@us.edu.pl

Recenzja pracy doktorskiej pt.

„Opracowanie i zastosowanie opartej na liniowej zależności Sterna-Volmera nowej metody rozdzielania widm fluorescencji układów trójskładnikowych”

autorstwa pana mgra Łukasza Witka

Już od wczesnych początków, intensywnemu rozwojowi chemii sprzyjała silna potrzeba otrzymywania związków o unikalnych własnościach wynikająca z konieczności zaspokajania bieżących potrzeb cywilizacyjnych. Dopiero później, oprócz żywego zainteresowania utylitarnymi aspektami syntezy nieorganicznej i organicznej, chemicy dostrzegli konieczność badania składu próbek i układów, kierując swą uwagę również na poznawanie określonych procesów. Niewątpliwie, chemia analityczna, dostarczająca odpowiednich narzędzi i metod, ułatwia poznawanie składu złożonych próbek i daje odpowiedź na temat ich składu jakościowego i ilościowego. Z kolei pozyskana w toku postępowania analitycznego informacja jest kluczowa dla pełnego zrozumienia zachodzących zjawisk. Dziś, nawet przeciętnemu obywatelowi, trudno wyobrazić sobie świat bez pozytywnego oblicza chemii, tzn. ogromnych możliwości jakie daje synteza nowych związków, a także bez narzędzi i metod wspomagających oznaczanie składu chemicznego próbek. Niniejsza praca doktorska, łączy w sobie oba wątki – syntezę i analizę. W moim subiektywnym z racji chemometrycznych zainteresowań odczuciu szczególnie interesujący w pracy pana mgra Łukasza Witka jest motyw analityczny – próba poznania składu badanego przez niego unikalnego trójskładnikowego układu. Należy zwrócić uwagę, że pomimo szerokiej dostępności wielu technik analitycznych, w tym różnorodnych metod chromatograficznych, ustalanie komponentów chemicznych próbek w przypadku niektórych mieszanin związków nadal pozostaje problematyczne, a w niektórych przypadkach nawet niemożliwe. Stąd, pomocne są różnego rodzaju metody chemometryczne, które ułatwiają pozyskanie istotnej chemicznie informacji często pomimo znikomej rozdzielczości danej techniki analitycznej. Znakomitym przykładem jest wykorzystanie wielokanałowych detektorów w chromatografii, fluorescencyjnych widm wzbudzenia-emisji, aby pozyskiwać komplementarne informacje, choć w moim przekonaniu wciąż niedostateczne. W szczególności, na uwagę zasługują tzw. metody rozdzielania krzywych (z ang. *curve resolution*), które wspierają dekompozycję informacji zawartej w danych eksperymentalnych do odpowiednich

profilu spektralnych i stężeniowych poszczególnych komponentów mieszaniny/układu. Prace w tym obszarze, zapoczątkowane w szczególności przez prof. Kowalskiego, prof. Massarta, prof. Kvalheima, prof. Taulera, czy dra Vandeginste, sięgają wczesnych początków chemometrii. Niewątpliwie, przyczyniły się one do jej popularyzacji. Opracowane m.in. przez nich metody stanowią duże wsparcie dla chemików analityków, a także, jak stało się i w tym przypadku, są inspiracją do tworzenia nowych i zarazem doskonalszych metod.

Pan mgr Łukasz Witek zrealizował badania do swojej pracy doktorskiej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Zespole Badań Fotochemicznych i Luminescencyjnych pod kierunkiem pana dra hab. Andrzeja Turka. Przedmiotem pracy doktorskiej jest zagadnienie rozdzielania złożonych profili widmowych i stężeniowych. W trakcie doktoratu pan mgr Łukasz Witek opracował nowy algorytm rozdzielania widm fluorescencyjnych, którego efektywne działanie wykazał badając układ złożony z trzech dominujących konformerów trans-1,2-di(2-antrylo)etenu. Należy nadmienić, że rozdział mieszaniny tychże konformerów metodami fizyko-chemicznymi jest niemożliwy, natomiast ich widma elektronowe da się skutecznie wyodrębnić. Wyniki uzyskane za pomocą zaproponowanej metody zostały porównane z wynikami otrzymanymi stosując klasyczne metody rozdzielania złożonych profili widmowych i stężeniowych. Autor dowiódł, że Jego metoda pozwala uzyskać lepsze widma czystych składników niż te, które zostały skonstruowane za pomocą klasycznych metod.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, napisana w języku polskim, składa się z sześciu głównych rozdziałów, a także trzech dodatkowych części, które obejmują spis literatury (199 pozycji), uzupełnienia oraz wykaz osiągnięć autora pracy. Łącznie, praca doktorska obejmuje 130 stron. Układ pracy doktorskiej i jej edycja nie budzą moich zastrzeżeń. Należy zwrócić uwagę na staranną edycję tekstu, spójną nomenklaturę, przejrzystość równań i ładną szatę graficzną. Ponadto, przedstawiane w pracy liczne barwne ilustracje bardzo pomagają w zrozumieniu prezentowanych treści i wyników. Są one czytelne, a podpisy osi i inne informacje na nich przedstawione wyraźne. Można także odnieść wrażenie, że autor dołożył wszelkich starań aby w Jego badaniach została uwzględniona aktualna wiedza i dotychczas znane metody. W swojej pracy doktorskiej swobodnie powołuje się na liczne doniesienia literaturowe. Ich dobór jest niezwykle trafny, a zbiór pozycji literatury obejmuje wszystkie historycznie istotne prace, wprowadzające czytelnika w kluczowe zagadnienia związane z wyodrębnianiem profili spektralnych czystych składników.

W pierwszym rozdziale pracy doktorskiej autor przedstawia cel prowadzonych przez siebie w ramach doktoratu badań. Nadrzędnym Jego zamierzeniem jest opracowanie nowych scenariuszy podejść do rozdzielania widm wygaszanej fluorescencji dla wybranego trójskładnikowego układu. W szczególności zamierza rozszerzyć stosowalność istniejącego podejścia rozdzielania widm wygaszanej fluorescencji dla

dwuskładnikowych układów uwzględniającego zależność Sterna-Volmera do układów zawierających trzy fluorofory.

Wstęp teoretyczny, który został zamieszczony w drugim rozdziale pracy doktorskiej, rozpoczyna prezentacja metod analizy głównych składowych (PCA) oraz analizy czynnikowej (FA). Są to dwie prawdopodobnie najbardziej znane i powszechnie stosowane metody dekomponujące wielowymiarowe dane eksperymentalne. Pozwalają one uzyskać informacje na temat zależności pomiędzy obiektami i pomiędzy zmiennymi tworzącymi zbiór danych, poprzez tzw. ukryte zmienne tworzące model. W tym miejscu należy nadmienić, że wielowymiarowe dane eksperymentalne, oprócz użytecznej chemicznie informacji zawierają również pewną zbędną część. Stąd, zagadnienie eliminacji tej drugiej jest niezwykle ważne. Zazwyczaj, pożądaný efekt uzyskuje się poprzez uważną redukcję wymiarowości danych. Jeśli zabieg powiedzie się, wówczas, interpretacja struktury danych staje się zdecydowanie łatwiejsza. W najbardziej prostym wariacie, redukcja wymiarowości wielowymiarowych danych eksperymentalnych może ograniczyć się do wyboru spośród dostępnych zmiennych tylko niektórych, tzn. tych, które oddają istotę badanego fenomenu. Druga możliwość redukcji wymiarowości danych uwzględnia konstrukcję zbioru kilku ukrytych zmiennych, które efektywnie opisują dane. Sposób ich tworzenia determinuje obrana funkcja celu. Warto zasygnalizować, że ta grupa podejść to tzw. metody projekcji. Dekomponują one dane eksperymentalne, charakteryzowane przez macierz danych, do dwóch macierzy ukrytych zmiennych. Pierwsza z nich opisuje zależności pomiędzy próbkami (obiektami) natomiast druga oddaje zależności pomiędzy zmiennymi. Liczba ukrytych zmiennych określa kompleksowość modelu i zarazem świadczy o stopniu złożoności badanego zjawiska. Rząd macierzy danych, który jest ściśle określonym pojęciem matematycznym i mówi o liczbie niezależnych zmiennych, w przypadku danych eksperymentalnych jest zazwyczaj daleki od faktycznej liczby chemicznych składników układu. Można zatem powiedzieć, że informacja na temat tzw. czystych składników, pozyskana na drodze dekompozycji danych jest dla chemika kluczowa, gdyż pozwala zrozumieć istotę i dynamikę zachodzących w badanym układzie procesów. Właśnie dlatego, autor skupił się na przedstawieniu dwóch klasycznych technik dekompozycji dwuwymiarowych danych - PCA i FA, które w przypadku spełnienia prawa Lamberta-Beera, umożliwiają konstrukcję zbioru kilku profili stężeniowych składników i odpowiadających im widm. Aczkolwiek metody PCA i FA są znakomitym przykładem modeli dekompozycyjnych, to w kontekście konstrukcji profili spektralnych mają one poważne ograniczenie. Niestety nie gwarantują one swym użytkownikom otrzymania rzeczywistych profili stężeniowych i spektralnych z powodu możliwej swobody rotacji rozwiązań. W ostatnich latach opracowano różne metody, które ułatwiają konstrukcję rzeczywistych profili stężeniowych i spektralnych. Wśród nich są takie metody jak analiza czynnikowa iteracyjnej transformacji namiarowej, metody wykorzystujące analizę rzędu podmacierzy (np. analiza ewoluujących czynników), metody bazujące na anihilacji rzędu macierzy czy metoda skorelowanych danych spektralnych. W podrozdziale 2.2 autor, w sposób bardziej szczegółowy, omawia

poszczególne grupy metod rozdzielania krzywych wielu zmiennych. Wprowadza ich podział na metody samo-modelowania, metody twardego modelowania oraz metody wielo-macierzowe. Zwraca również uwagę na relatywnie dużą popularność metody naprzemiennych najmniejszych kwadratów (ALS), której największą zaletą jest możliwość implementacji różnego rodzaju warunków wpływających na konstruowane profile. W toku procedury iteracyjnej na konstruowane profile można narzucić takie warunki jak nieujemność, selektywność obszarów, obszary o zerowych wartościach, unimodalność oraz domknięcie stężeniowe. W odróżnieniu od metod samo-modelowania, w przypadku tzw. 'twardych' modeli profile stężeniowe i spektralne są konstruowane poprzez optymalizację zdefiniowanej funkcji błędu wyprowadzonej dla określonego równania fizyko-chemicznego. W szczególności, tego typu metody znajdują zastosowanie w przypadku badania układów, które można opisać relatywnie prostymi reakcjami chemicznymi. Z kolei tzw. metody wielo-macierzowe bazują na konstrukcji profili stężeniowych i spektralnych dla zbioru kilku macierzy danych. W zależności od zawartości informacyjnej tychże macierzy, można wyróżnić podejście uogólnionej anihilacji rzędu macierzy (GRAFA) czy równoległą analizę czynnikową (PARAFAC). W kolejnych sekcjach pracy autor bliżej omówił oba podejścia.

Rozdział trzeci pracy doktorskiej bardziej szczegółowo zapoznaje czytelnika ze zjawiskami fluorescencji i fosforescencji, zachodzącymi w wyniku aktu absorpcji kwantów promieniowania przez cząsteczki. Autor charakteryzuje również czas życia fluorescencji jako jeden z istotnych parametrów oraz zjawisko wygaszania fluorescencji. W kontekście prowadzonych badań, definiuje i charakteryzuje liniową zależność intensywności fluorescencji od stężenia wygaszacza opisaną równaniem Sterna-Volmera. Ponadto, zwraca uwagę na rolę temperatury jako parametru wpływającego na wartość stałej Sterna-Volmera.

Czwarty rozdział pracy doktorskiej autor poświęcił nowemu algorytmowi rozdzielania widm układów trójskładnikowych. Jego propozycja łączy w sobie podejście PCA wzbogacone o optymalizację funkcji błędu dla równania Sterna-Volmera, które zostało rozszerzone do badania układów o trzech fluoroforach. Swój pomysł autor zaczerpnął z artykułu Lawton'a i Sylwestre'a z 1971 roku, którzy wprowadzili podejście dedykowane analizie układów dwuskładnikowych oparte o ideę samo-modelowania. Ciekawym aspektem omawianym w tejże publikacji jest możliwość ustalenia przedziału możliwych rozwiązań, tzn. możliwych widm pojedynczych składników. W przypadku dwuskładniowego układu, rozwiązania znajdują się na linii prostej w dwuwymiarowej przestrzeni zdefiniowanej przez dwa wektory własne. W podrozdziale 4.2 autor pracy doktorskiej opisuje sposób symulacji układu trzech fluoroforów poprzez zmianę wartości ich stałych wygaszania, a także dobór różnych stężeń wygaszacza. Odpowiednio zmieniając wspomniane parametry, autor skonstruował macierz danych. Zawiera ona symulowane widma układu wraz z homoscedastycznym szumem na poziomie 0,1% w stosunku do maksymalnej intensywności wszystkich symulowanych widm. W części 4.2.1 autor wyprowadza funkcję celu dla układów trójskładnikowych uwzględniającą liniowe równanie Sterna-Volmera. Omawia konstrukcję płaszczyzny

normalizacyjnej, która jest zdefiniowana przez trzy wektory własne wedle równania 4.12. Zgodnie z teorią, na płaszczyźnie normalizacyjnej znajdziemy punkty odpowiadające widmom układu trójskładnikowego. Ponadto, ich możliwe położenie na płaszczyźnie faktycznie jest ograniczone do pola trójkąta, w którego wierzchołkach znajdziemy widma czystych składników, natomiast na bokach widma układów dwuskładnikowych, a w jego wnętrzu punkty odpowiadające widmom układów trójskładnikowych. Ułamek spektralny danego składnika można ustalić na podstawie stosunku odpowiednich pól powierzchni trójkątów, które oblicza się w oparciu o metodę wyznaczników. Autor wyprowadza następnie funkcję celu, przyjmującą ostateczną postać określoną równaniem 4.18. Aby uprościć dalsze obliczenia, autor zdecydował się użyć widma różnicowe, które uwzględniają wkłady dwóch składników. W celu oznaczenia w wieloskładnikowej mieszaninie pojedynczego analitu, można wykorzystać metodę anihilacji rzędu macierzy (RAFA). Nazwa w pełni oddaje sposób jej działania. Wymaga ona rejestracji macierzy widm dla badanego układu opisanego np. poprzez macierz widm wzbudzenia-emisji, a także macierzy charakteryzującej roztwór wzorcowy, tzn. zawierający tylko analit o znanym stężeniu. Rozszerzeniem tego podejścia do przypadku, w którym używa się jednocześnie kilku standardów, jest uogólniona metoda anihilacji rzędu macierzy (GRAM). Autor nadmienia, że odpowiednio przygotowane układy, dla których w obu macierzach jest ta sama liczba składników pozwala konstruować macierz widm różnicowych, bez danego składnika. W prowadzonych badaniach, autor skonstruował dwie macierze. Pierwsza zawiera widma fluorescencji zmierzone dla układu bez wygaszacza, a druga widma rejestrowane w sytuacji, gdy w układzie jest obecny wygaszacz. Odpowiednie macierze resztkowe dla poszczególnych trzech fluoroforów opisano za pomocą równań 4.27 a-c. W zależności od doboru wartości parametru tau, możliwa jest anihilacja wkładu jednego ze składników, a co za tym idzie modyfikacja macierzy widm różnicowych. W podrozdziale 4.3 autor koncentruje się na przedstawieniu sposobu wyznaczania wartości intensywności parametru tau. Pierwszy z nich, tzw. niebezpośredni, pozwala estymować wartość parametru tau na podstawie analizy zmian wartości własnych macierzy wariancji-kowariancji widm różnicowych, zdefiniowanych równaniem 4.22. W szczególności, interpretuje się przebieg zależności logarytmu naturalnego trzeciej wartości własnej od wartości parametru tau. Przykładowe krzywe zmian parametru tau, obrazujące zaniki fluorescencji dla określonych sześciu stężeń wygaszacza, przedstawia rysunek 4.8. Charakterystyczne minima odpowiadają optymalnej wartości tau. Drugi sposób wyznaczenia optymalnych wartości parametru tau, tzw. bezpośredni, bazuje na sposobie zaproponowanych przez Lorber'a poprzez rozwiązanie zagadnienia własnego, które określa równanie 4.30. Należy również nadmienić, że ta modyfikacja, w sposób znaczący, pozwoliła wyeliminować niedogodności przypisywane metodzie RAFA. Ponadto, autor pracy sygnalizuje, że wyznaczone za pomocą pośredniego i niebezpośredniego podejścia wartości parametru tau zasadniczo nie różnią się od siebie. Estymowane wartości parametru tau można następnie wykorzystać do obliczenia wartości stałych Sterna-Volmera dla każdego ze składników układu. Następnie, w dalszej części pracy doktorskiej przedstawiono ideę konstrukcji funkcji błędu dla

dwuskładnikowych różnicowych widm fluorescencji, którą wyprowadzono z przekształcenia liniowego równania Sterna-Volmera docelowo określając jej postać dla zmodyfikowanego równania Sterna-Volmera (równanie 4.44). W podrozdziale 4.2.8 autor opisał wpływ różnych czynników na jakość uzyskanych profili spektralnych. Były to różne stężenia wygaszacza, różne wartości stałych Sterna-Volmera, a także dwie różne amplitudy homoscedastycznego szumu. Przeprowadzone obliczenia wskazują, że w przypadku małych względnych różnic i relatywnie niskich wartości stałych Sterna-Volmera skonstruowane widma, zdaniem autora, znacznie różnią się od widm oczekiwanych. Jako potencjalny powód tego stanu rzeczy podaje zbyt małe zróżnicowanie wkładów poszczególnych składników. Stosowane widma różnicowe zostały obliczone zgodnie z równaniem 4.22 oraz poprzez uwzględnienie czynnika skalującego tau, zmieniającego się w przedziale od zera do jeden. Autor twierdzi, że przeprowadzone przez niego obliczenia dla różnych wartości parametru tau nie wykazują istotnych różnic pomiędzy profilami spektralnymi otrzymanymi na podstawie zbioru widm różnicowych konstruowanych na dwa różne sposoby. W podrozdziale 4.2.9 przedstawiono sposób wyznaczania widma trzeciego składnika, w sytuacji gdy są znane widma dwóch pozostałych. Jednakże, to zagadnienie okazało się trudne do rozwiązania na drodze optymalizacji funkcji błędu opisanej równaniem 4.18. Przyczyny tego stanu rzeczy autor upatruje w relatywnie dużej liczbie parametrów. Natomiast, w przypadku gdy znane są widma dwóch składników układu, można w łatwiejszy sposób wyznaczyć widmo trzeciego na drodze optymalizacji funkcji błędów dla układu o dwóch składnikach opisanych równaniami 4.45 a oraz b. Wynikiem ich optymalizacji są tzw. ścieżki optymalizacyjne, a poszukiwane rozwiązanie znajduje się w punkcie ich przecięcia. Uzyskane rozwiązania, czego dowodzą odtworzone widma dla składników A i C, są bardzo zbliżone do symulowanych widm czystych składników. W przypadku odtwarzania widma składnika B zadowalającego wyniku nie uzyskano. Autor tłumaczy to jakością widma składnika C. W podrozdziale 4.2.10 autor przedstawił dokładny opis wyznaczania wierzchołków trójkąta leżącego w płaszczyźnie normalizacyjnej. Na podstawie widm różnicowych fluorescencji, widma czystych składników układu można wyodrębnić poprzez ponowne użycie metody anihilacji rzędu macierzy, co autor opisał w podrozdziale 4.2.11. Dotychczas prowadzona w pracy doktorskiej dyskusja uwzględniała wyniki uzyskane dla symulowanych układów trójskładnikowych, jednocześnie dowodząc na ich podstawie użyteczność proponowanej metody. Stąd, w kolejnej części pracy autor poddaje analizie drugi modelowy układ, ale utworzony przez rzeczywiste widma. Zawiera on trzy fluorofory takie jak 9-cyjanoantracen (CNA), 9-chloro-10-cyjanoantracen (ClCNA) i 9,10-dicyjanoantracen (DCNA) w metanolu. Wygaszanie ich fluorescencji przeprowadzono za pomocą bromku litu. W badaniach wykorzystano sześć roztworów o różnym stężeniu wygaszacza w zakresie od 0 do $0,023 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ i stałym stężeniu fluoroforów równym $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Macierze widm wzbudzenia-emisji zarejestrowano wzbudzając fluorescencję układu promieniowaniem elektromagnetycznym o długości fal 365, 368, 371, 374 i 377 nm. Uzyskane widma zostały następnie skorygowane poprzez usunięcie tła (widma zarejestrowane dla metanolu w tych samych warunkach pomiarowych). Dodatkowo, skorygowano widma

eliminując drugorzędowy efekt filtra wewnętrznego. Wyznaczono wartości intensywności parametru tau oraz stałe Sterna-Volmera dla poszczególnych fluoroforów. W kolejnych krokach metody, poprzez optymalizację odpowiednio dobranej funkcji błędu autor skonstruował widma dla każdego z dwóch składników. Jak zauważa, w przypadku danej pary nie różnią się one od siebie w sposób istotny. Wyznaczenie widma trzeciego składnika układu rzeczywistego przeprowadzono w oparciu o procedurę analizy ścieżek optymalizacyjnych. Zgodnie z zestawionymi na Rys. 4.22 b parami widm (widmo czystego składnika i widmo uzyskane proponowaną metodą), można stwierdzić, że wykazują one dużą zgodność w przypadku CNA i CICNA. Z kolei kształt różnicowego widma fluorescencji widma czystego składnika DCNA zasadniczo jest zbieżny z kształtem odpowiadającego mu widma estymowanego proponowaną metodą, aczkolwiek w niewielkim zakresie wartości intensywności są ujemne. Następnie, proponowane podejście zostaje porównane z trzema klasycznymi metodami: MCR-ALS, twardej model oraz PARAFAC. W przypadku profili spektralnych konstruowanych metodą MCR-ALS, w zależności od przyjętych profili startowych, uzyskano widma o różnej zbieżności. Obrazują to widma przedstawione na Rys. 4.23 a oraz b. W przypadku twardego modelowania niestety nie udało się rozdzielić układu i uzyskać widma trzech fluoroforów. Natomiast widma skonstruowane za pomocą metody PARAFAC były w dużym stopniu zbieżne z widmami czystych składników. Na końcu rozdziału, w części 4.3.2.4 autor podsumowuje otrzymane wyniki. Z przedstawionego opisu można odnieść wrażenie, że preferowaną metodą jest model PARAFAC, gdyż nie wymaga dodatkowych parametrów charakteryzujących badany układ. Porównanie proponowanej metody i podejścia PARAFAC wskazuje na dużą zbieżność pomiędzy wynikami.

Rozdział piąty pracy doktorskiej zawiera informacje na temat własności fotofizycznych trans-1,2-di(2-antrylo)etenu i procedur wieloetapowej syntezy tego związku. Autor opisuje zagadnienie dynamicznej równowagi w roztworach na przykładzie trans-1-fenylo-2-(2-antrylo)etenu. Przywołuje także zasadę NEER. W kolejnym podrozdziale została szczegółowo opisana procedura wieloetapowej syntezy trans-1,2-di(2-antrylo)etenu, której kolejne reakcje przedstawiono na Schemacie 5.1. Autor szczegółowo opisuje metodykę otrzymywania produktów pośrednich, które są niezbędne do syntezy docelowego związku. Aby wyznaczyć charakterystyczne własności cząsteczek wykorzystano obliczenia kwantowo-mechaniczne, których celem było poznanie geometrii oraz względnych wartości energii poszczególnych rotamerów. Obliczenia przeprowadzono w programie Gaussian09. Następnie, autor skupił się na rozdzieleniu widm wygaszanej fluorescencji mieszaniny konformerów trans-1,2-di(2-antrylo)etenu. Są to związki, które w zależności od długości fali wzbudzającej wykazują odmienną fluorescencję. Przygotowano serię roztworów zawierających różne zawartości wygaszacza fluorescencji, którym był fumaronitryl. Badany związek rozpuszczono w toluenie. Z próbek usunięto tlen, przepuszczając przez przygotowane próbki argon. Po uzyskaniu widm fluorescencji i absorpcji dokonano korekcji widm odejmując tło pochodzące od rozpuszczalnika. Wykorzystanie różnych kryteriów aby

oszacować liczbę czynników głównych pozwoliło wykazać, że badany układ jest faktycznie trójskładnikowy. Następnie, wykorzystano opracowaną metodę w celu wyznaczenia widm poszczególnych składników układu jednocześnie porównując uzyskane widma do widm konstruowanych alternatywnymi podejściami (GRAM, PARAFAC, twarde modelowanie i MCR-ALS). Wyniki przedstawione w podrozdziale 5.3.5, które opisują czasy życia fluorescencji poszczególnych konformerów, wskazują, że najdłuższym czasem życia fluorescencji charakteryzuje się rotamer o strukturze rozciągniętej w kierunku wiązania podwójnego.

W rozdziale szóstym autor przedstawił podsumowanie swoich badań i płynące z nich wnioski. Ogólnie można powiedzieć, że wytyczony cel nadrzędny i cele pośrednie zostały przez autora osiągnięte. Zaproponowane podejście można stosować do układów trójskładnikowych, których fluorofory wykazują względnie duże różnice w stałych Sterna-Volmera, a poziom szumu jest relatywnie mały. Może być postrzegane jako alternatywne podejście w stosunku do metod MCR-ALS, PARAFAC i twardego modelowania. Dodatkowo, autorowi udało się skutecznie przeprowadzić syntezę trans-1,2-di(2-antrylo)etenu, która ze względu na liczbę etapów i produktów pośrednich była dużym wyzwaniem. Zaproponowane podejście, zastosowane do rozdzielania widm rotamerów trans-1,2-di(2-antrylo)etenu, niestety nie pozwoliło uzyskać oczekiwanych widm czystych składników, w odróżnieniu od wyników uzyskanych metodą GRAM i PARAFAC.

Z powodu pełnionej roli recenzenta, poniżej zamieszczam kilka szczegółowych uwag dotyczących treści i wyników badań przedstawionych w pracy doktorskiej. W tym miejscu chciałem zaznaczyć, że nie mają one wpływu na mój bardzo pozytywny odbiór tematyki pracy i w żadnej mierze nie podważają zasadności przeprowadzonych badań.

- 1) Pomimo dużej staranności i uwagi, niestety autorowi pracy doktorskiej nie udało się uniknąć kilku drobnych niedociągnięć gramatycznych. Na przykład, na stronie 18 „wymaga zarejestrowani dwóch macierzy danych” czy na stronie 69 „przedstawiono szkic algorytm”.
- 2) Strona 18: dla jednej z metod autor definiuje akronim GRAFA, a w dalszej części pracy również używa dla tej samej metody akronimu GRAM. Pomimo, że w literaturze metoda określana jest dwoma akronimami, w pracy jest to zbędne i wprowadza niespójność.
- 3) Strona 38: co dokładnie oznacza zapis pierwszej sumy i indeks lambda?
- 4) Strona 54: autor używa sformułowania „znaczne odstępstwa”. Na jakiej obiektywnej podstawie do takiego właśnie wniosku można dojść? Ponadto, co prawda podaje on powód tychże odstępstw, aczkolwiek zastanawiam się dlaczego w przypadku symulowanych układów nie przebadał zakresu stosowalności, a jedynie ograniczył się do stwierdzenia: „Jednak w praktyce ze względu na ograniczoną rozpuszczalność osiągnięcie wymaganych dużych stężeń wygasaacza fluorescencji może okazać się

- niewykonalne.". Bardziej systematyczna i krytyczna ocena wpływu parametrów na podstawie wyników uzupełnionych o dodatkowe symulacje byłaby wskazana.
- 5) Strona 54: w mojej ocenie brakuje obiektywnej charakterystyki ilościowej skonstruowanych profili spektralnych. Jest to możliwe, gdyż dla symulowanego układu o znanych widmach czystych składników relatywnie łatwo można oszacować wartość błędu odtworzenia profili przez daną metodę.
 - 6) Podrozdział 4.3.2.1 i 4.3.2.3: brakuje informacji czy podczas konstrukcji widm wzięto pod uwagę dodatkowe założenia.
 - 7) Dlaczego, dopiero w przypadku metody PARAFAC autor zdecydował się zamieścić uzyskane wyniki w formie tabelarycznej, w której scharakteryzował konstruowane modele za pomocą parametru LOF? Moim zdaniem, dla zachowania symetrii prezentacji wyników, parametr LOF powinien zostać obliczony w każdym omawianym przypadku.
 - 8) Strona 75: dlaczego autor uważa, że zaproponowane podejście i metoda PARAFAC są 'komplementarne'? Mam wrażenie, że w tej sytuacji znacznie trafniejszym określeniem jest użycie terminu 'metody alternatywne'.

Podsumowanie:

Pan mgr Łukasz Witek w swoim dorobku naukowym ma pięć publikacji, które ukazały się w recenzowanych czasopismach. W jednej z nich, w której wprowadza oryginalną metodę, będącą przedmiotem niniejszej pracy doktorskiej, jest pierwszym autorem. Wszystkie artykuły zostały zamieszczone w czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej. Ponadto, brał udział w konferencjach o zasięgu krajowym, na których przedstawił jeden komunikat ustny i dwa plakaty.

Po zapoznaniu się z pracą doktorską pana mgra Łukasza Witka, a w szczególności po dokonaniu analizy jej treści, koncepcji, sposobu prowadzenia przez niego badań i uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników, twierdzę, że praca przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu badawczego. Ponadto, badania zostały wzbogacone o nietrywialny element - syntezę trans-1,2-di(2-antrylo)etenu. Dodatkowym cennym efektem są opracowane w kodzie Matlab wybrane procedury obliczeniowe, w tym nowa metoda i udostępnienie kodów w pracy. Jestem przekonany, że pan mgr Łukasz Witek posiada solidną wiedzę teoretyczną, umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych i stosowne umiejętności w dyscyplinie. Moja ocena merytoryczna pracy doktorskiej jest bardzo wysoka.

Niniejszym stwierdzam, że praca doktorska pana mgra Łukasza Witka spełnia wymagania określone w Art. 13. *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* z dnia 14 marca 2003 r. (Dz.U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami). Zarazem, wnioskuje do Rady Wydziału Chemicznego Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie autora do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Michał Stankowski

Gi