



Dr hab. Tomasz Sawoszczuk, Prof. UEK

Kraków 08.09.2023

Katedra Mikrobiologii

Instytut Nauk o Jakości i Zarządzania Produktem

Uniwersytet Ekonomiczny w Krakowie

## RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pana mgr inż. Damiana Dąbrowskiego

**„Zastosowanie nowoczesnych metod rozdzielania sprzężonych ze spektrometrią mas do identyfikacji barwników organicznych”**

wykonanej pod kierunkiem

Promotora: dr hab. inż. Katarzyny Lech

Pracę doktorską przygotowano w Katedrze Chemii Analitycznej, Wydziału Chemicznego, Politechniki Warszawskiej.

### **Podstawa sporządzenia recenzji**

Podstawą formalną sporządzenia recenzji jest Uchwała Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne, Politechniki Warszawskiej z dnia 04.07.2023

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Damiana Dąbrowskiego powstała w dziedzinie naukowej Nauki Ścisłe i Przyrodnicze, w dyscyplinie Nauki Chemiczne. Praca dotyczy bardzo ważnego i aktualnego problemu naukowego, jakim jest rozdział i identyfikacja barwników organicznych różnego pochodzenia, należących do różnych grup związków barwnych. Rozwój tego typu badań jest szczególnie istotny z punktu widzenia oznaczeń



barwników stosowanych historycznie, do barwienia zabytkowych tkanin, w obrazach, czy innych barwnych obiektach historycznych. Przeprowadzenie identyfikacji barwników znajdujących się w obiekcie historycznym jest kluczowym etapem procesu planowania prac konserwatorskich. Dzięki tej wiedzy konserwatorzy mogą odpowiednio zabezpieczyć różne części obiektów, np. przed etapem oczyszczania na mokro. Zaproponowana metoda analityczna, która może być wykorzystywana do identyfikacji barwników organicznych, oparta jest w głównej mierze na chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. W pracy wyraźnie zaznaczono, iż w celu wykonania oznaczenia barwników zastosowanych do barwienia obiektów historycznych należy pobrać próbę z obiektu, w związku z tym jest to metoda niszcząca. Jednak w ramach realizacji badań do pracy doktorskiej poszukiwano rozwiązań dotyczących układu pomiarowego, który pozwoliłyby na zminimalizowanie ilości próbki, potrzebnej do przeprowadzenia analizy barwników. Dążono do opracowania metody analitycznej charakteryzującej się jak najwyższą czułością, przy wykorzystaniu jak najmniejszej ilości badanego materiału. W tym celu wykorzystano nowoczesne rozwiązania analityczne bazujące na różnych wariantach wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) połączonej z detekcją tandemowej spektrometrii mas, z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI MS/MS). W szczególności zoptymalizowano: parametry analizy wykonywanej w układzie pomiarowym kapilarna wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z tandemową spektrometrią mas, z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie ( $\mu$ HPLC-DAD-ESI MS/MS), w celu przeprowadzenia rozdziału i identyfikacji barwników alkaloidowych; parametry analizy wykonywanej w układzie nanoprzepływowy Chip-Cube-HPLC, składający się z dwóch kolumn, zatażającej i analitycznej, w połączeniu z tandemową spektrometrią mas, z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (HPLC Chip-Cube ESI MS/MS) do rozdziału i identyfikacji mieszaniny barwników syntetycznych; parametry analizy wykonywanej w układzie wysokosprawna chromatografia cieczowa w połączeniu z spektrofotometria UV-Vis i tandemową spektrometrią mas, z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (HPLC-UV-Vis ESI MS/MS) do rozdziału i identyfikacji mieszaniny barwników naturalnych i barwników z grupy apokarotenoidów. Metody pomiarowe rozwinięto z wykorzystaniem wzorcowych związków barwiących oraz barwników pozyskanych



własnoręcznie ze źródeł roślinnych. Opracowane metody umożliwiają rozdzielanie i identyfikację barwników organicznych przynależnych do różnych grup chemicznych, przy znaczącym ograniczeniu objętość badanych roztworów do minimum.

### **Cel i hipotezy badawcze**

Na początku rozprawy Doktorant zdefiniował cel pracy, którym było: opracowanie procedur analitycznych, które mogą być zastosowane do identyfikacji organicznych barwników pochodzenia naturalnego i syntetycznego, przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z tandemowym spektrometrem mas, z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (ESI MS). Kolejnym celem przedstawionym w pracy była ocena możliwości zastosowania różnorodnych kombinacji układów chromatograficznych: analitycznego, mikroprzepływowego układu kapilarnego i nanoprzepływowego zminiaturyzowanego układu lab-on-chip połączonych z tym samym detektorem, do rozdziału i identyfikacji różnych grup barwników organicznych. Przyjęte cele korespondują z tytułem rozprawy i jej treścią. **W pracy nie odnaleziono hipotez badawczych.**

### **Struktura pracy**

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska liczy 122 stron. Wyróżniono w niej: streszczenie, wprowadzenie, a następnie dwie główne części literaturową i doświadczalną, wnioski, literaturę, i załączniki. Część doświadczalna stanowi jest bardziej rozbudowana, w porównaniu do części literaturowej, i obejmuje materiały i metodykę badawczą, a także omówienie wyników. Bibliografia obejmuje 115 pozycji, w tym publikacje naukowe (polsko- i obcojęzyczne), a także odwołania do stron internetowych. Większość cytowanych pozycji została wydana przed 2011 rokiem. Odwołania do pozycji przedstawionych w bibliografii mają uzasadnienie wynikające z treści rozprawy i są dobrane prawidłowo. Sposób numeracji cytowanych pozycji literaturowych jest zgodny ze stylistyką stosowaną w literaturze naukowej. Uwagę zwraca jednak fakt, iż na stronie 23 cytowanie do rysunku ma numerację [113], podczas



gdy w treści, na tej samej stronie, numeracja cytowań kończy się na pozycjach [30-32]. W pracy znajduje się 18 tabel, 30 rysunków oraz 1 załącznik. Układ pracy jest logiczny i typowy dla tego typu opracowań badawczo-naukowych.

### **Część literaturowa**

Część literaturowa dysertacji obejmuje trzy rozdziały. Przed tą częścią Doktorant zamieścił w pracy Wprowadzenie, które obejmuje krótki wstęp oraz cel pracy. W pierwszym rozdziale części literaturowej Doktorant podał definicję barwników, pozwalającą odróżnić je od pigmentów. Następnie przedstawia podział barwników ze względu na źródło pochodzenia, kolor, formę wykorzystania barwnika do farbowania tkanin. W kolejnej części prezentuje charakterystykę wybranych grup naturalnych związków barwiących, kończąc rozdział opisem barwników syntetycznych. W rozdziale 2, części literaturowej, Doktorant przedstawia techniki analityczne stosowane do identyfikacji barwników znajdujących się w obiektach historycznych. Opisuje techniki pomiarowe oparte na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z obiektem oraz, w osobnym podrozdziale, wysokosprawną chromatografię cieczową. Doktorant przedstawia w treści tego podrozdziału głównie techniki pomiarowe, które były przez Niego wykorzystywane do prowadzenia badań, tj.: HPLC, chromatografia cieczowa mikro- i nano-przepływowa, układ Chip-Cube (lab-on-chip). W ostatnim podrozdziale opisuje technikę spektrometria mas z uwzględnieniem różnych metod jonizacji pod ciśnieniem atmosferycznym, w tym ESI, oraz tandemową SM. Część literaturową zamyka krótki rozdział 3, w którym scharakteryzowano wybrane wielkości statystyczne stosowane do opracowania wyników uzyskanych z analizy chromatograficznej. Część literaturowa opracowana została w oparciu o bogatą literaturę, co świadczy o dobrej znajomości tematyki. Należy zatem uznać wybór tematu pracy przez Doktoranta za w pełni uzasadniony z naukowego (poznawczego) punktu widzenia, jak i biorąc pod uwagę możliwości aplikacyjne opisanych metod, z którymi Doktorant jest dobrze zaznajomiony. Zastrzeżenia do tej części pracy zostaną podsumowane w Uwagach.

## Cześć doświadczalna

Cześć doświadczalna składa się z ośmiu podrozdziałów, z czego cztery pierwsze można uznać ogólnie za część zazwyczaj nazywaną materiały i metody, natomiast w czterech pozostałych podrozdziałach opisano metodykę badań oraz wyniki i ich analizę. Jest to rozbudowana część pracy (od str. 47 do 109). Materiał badawczy i zastosowane metody zostały omówione bardzo dokładnie. W trzecim rozdziale Doktorant opisuje szczegółowo przygotowanie roztworów wzorcowych: (i) barwników naturalnych, (ii) barwników syntetycznych, (iii) barwników naturalnych z grupy apokarotenoidów oraz (iv) barwników naturalnych alkaloidowych, które Doktorant pozyskał własnoręcznie, przygotowując ekstrakty z roślin. Dodatkowo barwniki te zostały wykorzystane do zabarwienia włókien jedwabiu i wełny, a następnie zostały wyekstrahowane z włókien i poddane analizie chromatograficznej. W kolejnym podrozdziale, czwartym, Doktorant opisuje „Parametry aparaturowe”. Dane prezentowane w czterech tabelach przedstawiają parametry pracy zestawów pomiarowych, upraszczając LC-MS, w trakcie rozdziału i analizy czterech, opisanych powyżej grup barwników. W tym miejscu Doktorant daje do zrozumienia czytelnikowi, iż każda z czterech wspomnianych grup barwników będzie poddana analizie w innym zestawie pomiarowym, bez uzasadnienia swojej decyzji. Barwniki naturalne oraz barwniki z grupy apokarotenoidów były analizowane w układzie HPLC-UV-Vis-ESI MS/MS, przy czym zastosowano o obu przypadkach inne kolumny i inne parametry analizy. Barwniki alkaloidowe poddano analizie w układzie  $\mu$ HPLC-DAD-ESI MS/MS, natomiast barwniki syntetyczne zanalizowano w układzie HPLC-Chip-Cube-ESI MS/MS. W kolejnych czterech podrozdziałach Doktorant opisał analizę chromatograficzną, przeprowadzoną w opisanych powyżej czterech układach – dobranych do danej grupy barwników, według schematu: optymalizacja parametrów rozdziału, optymalizacja parametrów jonizacji i analizy w spektrometrze mas, wyniki analizy zebrane w tabeli, podsumowanie. Wyniki optymalizacji oraz analizy barwników przedstawiono w następujących po sobie podrozdziałach w kolejności: barwniki alkaloidowe (w tym również analiza ekstraktów z roślin i ekstraktów z włókien barwionych ekstraktami roślinnymi), barwniki naturalne, barwniki z grupy apokarotenoidów, barwniki syntetyczne. Dla wszystkich czterech grup barwników Doktorant uzyskał krzywe kalibracyjne, na podstawie wyników analizy

przeprowadzonej dla przygotowanych zestawów roztworów wzorcowych. Zaprezentowane wyniki poddano wnikliwej analizie statystycznej, wyznaczając dla każdego badanego barwnika granicę oznaczalności oraz granicę wykrywalności. Doktorant wykazał się dużą dojrzałością naukową planując doświadczenia, które wymagały całościowego spojrzenia na problem badawczy. Należy również docenić ilość pomiarów, które zostały wykonane, zarówno na etapie optymalizacji parametrów analizy, jak i w trakcie właściwych badań.

## **Wnioski**

Praca zakończona jest rozdziałem Wnioski, który jest bardzo zwięzły i mało szczegółowy. Doktorant zaznacza, iż zastosowanie nowoczesnych układów opartych na zestawie chromatografia cieczowa – tandemowa spektrometria mas pozwala na opracowanie wysokoczułych metod analitycznych wykorzystywanych do rozdzielania i identyfikacji barwników organicznych, nadal jednak nie uzasadnia, dlaczego cztery grupy barwników były analizowane w czterech różnych układach pomiarowych. Doktorant zwrócił uwagę na wszystkie uzyskane w trakcie badań wyniki. Wnioski zostały podzielone na cztery części, co zdecydowanie pozytywnie wpływa na przejrzystość tekstu. Konkluzją doktoratu jest potwierdzenie, iż zastosowanie w analizie barwników organicznych układów mikro- i nano-przepływowych umożliwia zmniejszenie ilości materiału pobieranego do badań, bez obniżenia jakości uzyskiwanych wyników.

## **Uwagi do pracy**

Oceniana dysertacja została przygotowana z dbałością o poprawność językową i stronę redakcyjną, w pracy występują jednak błędy związane z przedstawieniem liter bądź niewłaściwymi końcówkami poszczególnych wyrazów, błędy interpunkcyjne czy niefortunne sformułowania.

W pracy nie została przedstawiona hipoteza badawcza. Wyniki badań uzyskane przez Doktoranta pozwoliłyby potwierdzić lub obalić postawioną hipotezę. Tytuł pracy sugeruje



czytelnikowi, iż zapozna się z wieloma metodami rozdzielania, tymczasem praca dotyczy tylko chromatografii cieczowej. W rozdziale 2.1 Doktorant przedstawia charakterystykę wysokosprawnej chromatografii cieczowej, przy czym czytelnik zostaje poinformowany tylko o dwóch elementach układu pomiarowego o pompie i zaworze z pętlami dozującymi. Brak syntetycznego opisu budowy całego aparatu, brak informacji o kolumnach. W części doświadczalnej uwagę zwraca fakt, iż opis aparatury, odczynników etc. zajmuje aż 5 stron, jest to zdecydowanie zbyt długi spis. W rozdziale 4 czytelnikowi zostaje przedstawiona informacja, iż badane będą 4 grupy barwników organicznych, przy czym każda z grup zostanie poddana analizie w innym układzie pomiarowym, bez wyraźnego uzasadnienia, dlaczego akurat dana grupa barwników będzie poddana analizie w wybranym dla niej układzie pomiarowym, a nie w innym. Poza tym, nie znając dalszej części pracy, czytelnik zastanawia się, dlaczego właśnie taki, a nie inny, zestaw parametrów analizy został przyjęty, w celu przeprowadzenia badań danej grupy barwników organicznych w danym układzie. Dopiero po przeczytaniu rozdziałów 5 – 8 czytelnik posiada wiedzę o przeprowadzeniu optymalizacji parametrów analizy. W przypadkach, gdy była stosowana kolumna chromatograficzna, brak informacji o temperaturze w jakiej następował rozdział. Przy opisach optymalizacji parametrów rozdzielania, jonizacji i analizy w MS brakuje macierzy parametrów, które były poddawane optymalizacji, znacznie ułatwiłoby to czytanie pracy. Opisy wyników procesu optymalizacji na stronie 64 oraz 79, w formie: „Pozostałe parametry nie miały znaczącego wpływu...” oraz „W przypadku pozostałych parametrów nie zauważono dużych różnic.”, są zbyt dużym uproszczeniem. Za pierwszy duży brak w pracy można uznać fakt, iż w części doświadczalnej Doktorant nie porównał w żaden sposób uzyskanych przez siebie wyników z wynikami przedstawionymi w literaturze, z osiągnięciami innych naukowców. Odniesienia do literatury można odnaleźć jedynie w części teoretycznej. Drugim elementem, którego brakuje w pracy to przeprowadzenie analizy oraz przedstawienie wyników badań barwników wyekstrahowanych z rzeczywistych, barwionych, zabytkowych włókien naturalnych. Badania takie byłyby znakomitym zwieńczeniem pracy. Inne drobne błędy w pracy to, np. zapis, iż „...obecnie ponad 90% analiz z użyciem HPLC....”, podczas gdy dane pochodzą z publikacji wydanej w 2009 roku, lub brak konsekwencji w kolejności cytowań, o czym już wspomniano powyżej.

## Podsumowanie

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pana magistra inżyniera Daniela Dąbrowskiego pt. „Zastosowanie nowoczesnych metod rozdzielania sprzężonych ze spektrometrią mas do identyfikacji barwników organicznych” mieści się w naukach Ścisłych i Przyrodniczych, w dyscyplinie Nauki Chemiczne. Autor wykazuje wyraźne umiejętności w korzystaniu z dotychczasowego dorobku nauki w zakresie prowadzonych przez Niego badań. Część doświadczalna pracy została zaplanowana poprawnie, wskazując na umiejętność samodzielnego planowania i prowadzenia badań, przy wykorzystaniu właściwie dobranych metod badawczych. Założony cel pracy został osiągnięty, choć brak wyników badań przeprowadzonych na rzeczywistych próbkach historycznych. Należy podkreślić niewątpliwie duży wkład pracy w przeprowadzenie tak licznych badań. Pod względem merytorycznym pracę oceniam pracę wysoko, choć w części doświadczalnej brak porównania wyników uzyskanych przez Doktoranta z danymi literaturowymi. Dysertacja napisana została poprawnym językiem, typowym dla prac o charakterze naukowym.

Po zapoznaniu się z przedstawioną do oceny pracą doktorską mgr inż. Daniela Dąbrowskiego stwierdzam, że spełnia ona wymogi formalne stawiane rozprawom doktorskim, określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 poz. 1789) w związku z art. 179 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 poz. 1669 z późn. zm.)

Wobec powyższych faktów wnioskuję do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Warszawskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Daniela Dąbrowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.