

Wrocław, 26.05.2021

Prof. dr hab. inż. Paweł Pohl
Katedra Chemii Analitycznej i Metalurgii Chemicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska

Wyb. Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
Tel.: 71-320-2494

**Recenzja pracy doktorskiej pani mgr inż. Magdaleny Borowskiej
pt.: *Zastosowanie nowych metodyk analitycznych w badaniu
właściwości detoksykacyjnych nanocząstek selenu w stosunku do
związków rtęci***

Według IUPAC (Koncepcje metrologiczne i jakościowe w chemii analitycznej, IUPAC, 2020) najważniejszymi oczekiwaniami stawianymi chemii analitycznej są rozwój i zastosowanie nowych strategii postępowania, urządzeń pomiarowych oraz procedur i metod analitycznych, które pozwolą w dogodny sposób pozyskać informację o składzie i naturze materii oraz zmianach tego składu i materii w czasie i przestrzeni. Praca doktorska pani mgr inż. Magdaleny Borowskiej, przygotowana na Politechnice Warszawskiej pod kierunkiem prof. dr hab. inż. Krzysztofa Jankowskiego, spełnia takie oczekiwania.

Nadrzędnym celem wspomnianej pracy doktorskiej jest opracowanie nowych metod analitycznych do zbadania właściwości detoksykacyjnych nanocząstek selenu (SeNP) w odniesieniu do związków nieorganicznych (Hg_n) i organicznych (Hg_o) rtęci. Nie mam wątpliwości, że tematyka niniejszej pracy doktorskiej i poruszane problemy środowiskowe oraz analityczne związane z badaniem wspomnianych oddziaływań związków Hg i SeNP sprawiają, że jest to praca ważna i wartościowa.

Chcąc badać oddziaływania związków Hg_n i Hg_o z SeNP, na samym początku (rozdział 8) Doktorantka opracowała metody chemicznej i biologicznej syntezy SeNP, w której prekursor nanocząstek był redukowany w roztworze do Se^0 o rozmiarach nanometrycznych przy użyciu glukozy w środowisku zasadowym oraz kwasem askorbinowym. Powstające SeNP stabilizowane były glukozą (pierwsza ze wspomnianych syntez) oraz niejonowym środkiem powierzchniowoczynnym Tween 80 (druga ze wspomnianych chemicznych). W przypadku syntezy biologicznej użyto ekstraktu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z dodatkiem glukozy. We wszystkich trzech przypadkach do określenia wydajności syntezy SeNP, Doktorantka użyła nowo opracowanej przez siebie metody analitycznej (rozdział 9), polegającej na oznaczeniu stężenia nieprzereagowanego prekursora SeNP, tj. jonów $Se(IV)$, poprzez generowanie lotnych związków Se w obecności kwasu octowego pod wpływem promieniowania z zakresu UV (PCVG, fotochemiczne generowanie par), oddzielenie tych związków od roztworu i detekcję analitu metodą optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej mikrofalami (MIP-OES). Parametry pracy wspomnianej metody PCVG-MIP-OES zostały zoptymalizowane poprzez dobranie odpowiedniego stężenia kwasu octowego oraz natężenia przepływu próbki. Określone zostały również odpowiednie warunki przygotowania próbek, tj. mieszanin poreakcyjnych, i sposobu wzorcowania Se w pomiarach stężenia tego analitu ww. metodą. Wyznaczone zostały wybrane parametry walidacyjne tej metody, w tym zakres liniowości, granica wykrywalności Se oraz precyzja pomiarów. Uważam, że metoda ta, ze względu na łagodne warunki reakcyjne i możliwość generowania lotnych związków Se tylko z jonów $Se(IV)$, ma duże znaczenie praktyczne w przypadku niechromatograficznego rozdzielania tych jonów od SeNP. *Nie znalazłem jednak, w jaki sposób wyznaczono poprawność wyników oznaczeń Se w analizowanych mieszaninach poreakcyjnych.* Informacji o tym nie ma również w opublikowanej [Microchemical Journal, 2019, 145:1169-1175] pracy Doktorantki. Doktorantka podaje na str. 84 swojej pracy doktorskiej, że „W celu poprawy dokładności oznaczeń w próbkach rzeczywistych, do roztworów wzorcowych dodano odpowiedniej ilości glukozy, Tween 80, pożywki hodowlanej, w zależności od analizowanej próbki (dopasowanie matrycy)”. Jest zrozumiałe, że wzorcowanie przy użyciu wzorców z dopasowaniem matrycy jest korzystniejsze niż bez tego dopasowania, w szczególności w przypadku derywatyzacji Se w złożonych matrycach. *Jednak nadal nie wiadomo ile wspomniana dokładność/prawdziwość wyników wynosi i czy ją*

wyznaczono. We wspomnianym rozdziale 9 (str. 78) znalazłem również informację, że średnicę SeNP wyznaczono na podstawie widm absorpcyjnych z zakresie UV-VIS ich roztworów koloidowych – zgodnie z metodą opisaną przez Li i wsp. [Materials Chemistry and Physics, 2005, 92, 591-594]. W cytowanej pracy jej autorzy stosowali jednak transmisyjny mikroskop elektronowy (TEM), żeby sprawdzić pokrój SeNP oraz wyznaczyć ich średni rozmiar wraz z jego rozkładem. Autorzy tej pracy znaleźli związek między maksimum pasm absorpcji powierzchniowego zlokalizowanego rezonansu plazmonowego (LSPR) SeNP a ich średnim rozmiarem, jednak nie podali żadnej zależności liczbowej. Dlatego szkoda, że na tym etapie pracy doktorskiej Doktorantka nie użyła innej metody badawczy, tj. TEM lub DLS, żeby po pierwsze sprawdzić, czy otrzymane SeNP były sferyczne, po drugie, żeby określić ich faktyczny rozmiar. Dlatego też zdanie odnoszące się w pracy doktorskiej do rysunku 9 (str. 80), „Kształt widma jest zgodny z teorią Mie, a średni rozmiar cząstek wyrażony jako średnica, określono na poziomie ok. 235 nm.” wymaga dopowiedzenia i/lub rozwinięcia, ponieważ dwa maksima absorpcji pasma LSPR świadczą o występowaniu SeNP o dwóch różnych rozmiarach. Ostatnia uwaga dotycząca tego rozdziału dotyczy stwierdzenia zamieszczonego na str. 81., tj. „...”, że użycie kwasu octowego o stężeniu 15% (v/v) jest wystarczające do przeprowadzenia reakcji PCVG z największą wydajnością. W pracy nie wyznaczono wydajności fotochemicznego generowania lotnych związków Se (zależać ona będzie od matrycy próbki), a rysunek do którego odnosi się to zdanie (rys. 10) podaje zależność sygnału analitycznego Se od stężenia kwasu octowego.

Za najciekawszą część pracy pani mgr Borowskiej uważam wyniki badań opisanych w rozdziale 10, gdzie na potrzeby badań detoksykacyjnych SeNP w odniesieniu do związków Hg_n i Hg_0 . Doktorantka opracowała oryginalną technikę łączoną, tj. PCVG-HS-SPME-TD-MIP-OES. Technika ta polegała na fotochemicznym generowaniu par Hg ze związków Hg_n lub Hg_0 w reaktorze przepływowym, ich mikroekstrakcji do fazy stacjonarnej włókna adsorpcyjnego z fazy nadpowierzchniowej w trybie zatrzymanego przepływu, desorpcji termicznej par Hg i ostatecznie ich detekcji metodą MIP-OES. Jestem przekonany, że opracowanie ww. techniki wymagało od Doktorantki przewyciężenia wielu problemów technicznych, które mogły wpływać na niestabilną pracę stosowanego źródła wzbudzenia małej mocy, tj. MIP-OES. Tym bardziej dokonania niniejsze pracy doktorskiej budzą moje wielkie uznanie, w szczególności wspomniana technika, jej charakterystyka analityczną i praktyczne

zastosowanie. Parametry pracy wspomnianej techniki łączonej, zapewniające najwyższy sygnał analityczny, zostały odpowiednio dobrane, w tym stężenie kwasu mrówkowego, natężenie przepływu próbki, objętość próbki, czas sorpcji analitów przez włókno. Określono wydajność fotochemicznego generowania par Hg w zaproponowanym przepływowym układzie reakcyjnym, wyznaczono również wybrane parametry walidacyjne tej metody dla jonów Hg i metylortęci (MeHg), w tym zakresy liniowości, czułość, granice wykrywalności oraz precyzję pomiarów. Prawdziwość wyników otrzymywanych opracowaną metodą wyznaczono analizując dwa materiały odniesienia, tj. osad denny, tkanka tłuszczowa. Opracowaną metodę zastosowano do śledzenia zmian stężenia jonów Hg i MeHg w trakcie ich inkubacji z SeNP (otrzymanymi z użyciem ekstraktu drożdży) w roztworze Ringera. W tym miejscu należy podkreślić fenomen opracowanej metody. Łagodne warunki reakcji fotochemicznego generowania par Hg połączone z ich mikroekstrakcją do fazy stacjonarnej z fazy nadpowierzchniowej zapewniały miarodajne (selektywne, czułe i dokładne) oznaczenie jonów Hg i MeHg niezaadsorbowanych na powierzchni SeNP z matrycy imitującej płyn ustrojowy. Uważam, że opracowana metoda z powodzeniem może być używana w wielu innych badaniach środowiskowych, gdzie ważne jest śledzenie zmian stężenia biodostępnej (niezwiązanej) frakcji związków Hg_n i Hg_o w obecności tego rodzaju związków zaadsorbowanych na powierzchni SeNP (lub innych nanomateriałów). Nie dziwi mnie stwierdzenie Doktorantki, że użycie skaningowej transmisyjnej mikroskopii elektronowej (STEM), potwierdziło, że SeNP posiadały rozmiar odmienny od tego, jaki wykazano na podstawie widm absorpcyjnych w zakresie UV-VIS. Wyniki natomiast oddziaływania obu badanych związków Hg z biosyntetyzowanymi SeNP są bardzo interesujące, w szczególności wykazanie silnego oddziaływania jonów Hg z powierzchnią użytego nanomateriału, tj. >90% adsorpcja tychże jonów na powierzchni SeNP i ich unieczynnienie w czasie ok. 1 godz. Wolniejszy przebieg „wiązania” jonów MeHg na powierzchni SeNP jest również obiecujący, w szczególności w kontekście ich możliwego maskowania i zmniejszenia toksyczności w środowisku na drodze adsorpcji na powierzchni SeNP. Cieszy mnie ogromnie, że wyniki nt. badania oddziaływań SeNP ze związkami Hg_n i Hg_o oraz opracowanej techniki sprzężonej, umożliwiającej oznaczanie niezwiązanych form Hg_n i Hg_o obok ich form zaadsorbowanych na powierzchni SeNP zostały opublikowane w bardzo dobrym czasopiśmie, tj. Talanta, 2020, 219, 121162.

Wyniki rozdziału 11 są równie ciekawe i wartościowe jak te zamieszczone w rozdziale 10. Doktorantka zastosowała identyczne podejście jak we wspomnianym rozdziale i opracowała wariant omawianej techniki łączonej PCVG-HS-SPME-TD-MIP-OES, zastępując reaktor przepływowy reaktorem stacjonarnym. Technika ta została użyta do selektywnego oznaczania trzech różnych form Hg, tj. jonów Hg(II), MeHg i etylortęci (EtHg) niezwiązanych z powierzchnią SeNP i SiO₂NP. Parametry pracy ww. metody zostały dobrane tak, by zapewnić najwyższe sygnały analitów, w tym stężenie kwasu mrówkowego, czas naświetlania próbki promieniowaniem z zakresu UV, objętość próbki, czas sorpcji analitu na włóknie adsorpcyjnym, temperatura desorpcji, przepływ gazu nośnego/plazmowego, moc dostarczona do plazmy. Doktorantka wykazała, że w zastosowanym reaktorze stacjonarnym w czasie naświetlania roztworu promieniowaniem z zakresu UV, pary Hg tworzą się na zasadzie procesu foto- i termochemicznej redukcji. W warunkach optymalnych zostały wyznaczone wybrane parametry walidacyjne opracowanej metody, w tym zakresy liniowości, czułość, granice wykrywalności, precyzja i prawdziwość wyników. Opracowana metoda została następnie z powodzeniem użyta do badań oddziaływań powierzchni SeNP (otrzymanych w toku biosyntezy z ekstraktem drożdży) z różnymi formami specjacyjnymi Hg (jony Hg(II), MeHg i EtHg), gdzie kinetykę tych oddziaływań w roztworze Riñgera określono na podstawie oznaczeń wspomnianych form Hg niezwiązanych z powierzchnią użytych SeNP. Otrzymane wyniki (rozdział 10 i 11) pozwoliły zaproponować Doktorantce prawdopodobny mechanizm zatrzymywania jonów Hg(II), MeHg i EtHg na drodze chemisorpcji (wiązanie Hg-Se) i potwierdzić ich obojętny charakter w środowisku. Doktorantka stwierdziła także, że w ciągu pierwszej godziny procesu, SeNP oddziałują z poszczególnymi związkami Hg z różną szybkością (Hg(II)>MeHg>EtHg). W ciągu następnych dwóch godzin różnice te zacierają się i osiągnięty jest stan równowagi między poszczególnymi formami. Do wyników badań obu tych rozdziałów nie mam żadnych uwag, a opracowaną metodę analityczną/ technikę łączonej uważam za bardzo przemyślaną i o dużym znaczeniu praktycznym.

W rozdziale 12 Doktorantka przedstawiła wyniki analizy produktu oddziaływania SeNP otrzymanych na drodze biosyntezy z użyciem ekstraktu drożdży z jonami Hg(II) i EtHg przy użyciu technik spektrometrii mas z jonizacją w plazmie sprzężonej indukcyjnie (ICP-MS) i optycznej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukowanej mikrofalami (MIP-OES), działających w trybie analizy pojedynczych

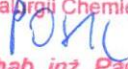
cząstek (SP). W pierwszym przypadku użyto komercyjnego oprogramowania MassHunter, będącego na wyposażeniu spektrometru mas. W drugim przypadku użyto wcześniej opracowanej metody (ze współudziałem Doktorantki, *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1089, 25-31) wraz z odpowiednim algorytmem rejestrowania sygnałów impulsowych i dalszej ich obróbki. Analizując otrzymane wyniki doktorantka stwierdziła, że rozkład rdzenia SeNP praktycznie nie zmienił się wtedy kiedy jony EtHg przyłączone były do SeNP. Kiedy miejsce jonów EtHg zajmowały jony Hg(II), zaobserwowano wzrost częstości występowania SeNP o mniejszym rozmiarze. Wyjaśniono to „tworzeniem się na powierzchni SeNP połączenia Se-Hg, prowadzącego do zubożenia rdzenia Se.”. Takie jednak wytłumaczenie wymaga zastanowienia i komentarza. W przypadku wprowadzania zawiesin SeNP do plazmy, pojedyncze SeNP ulegają odparowaniu, atomizacji i jonizacji. Jeżeli analizowane są SeNP z przyłączonymi jonami Hg(II), a rdzenia Se ubywa ilościowo kosztem tworzenia się „otoczki” SeHg, to intensywność rejestrowanych pulsów Se nie powinna znacząco różnić się od intensywności pulsów, które można zarejestrować dla „czystych” SeNP (tak jak w przypadku połączenia SeNP z jonami EtHg). Zatem przyczyna innego rozkładu wielkości SeNP, które oddziaływały z jonami Hg(II), może być inna.

Używając metody SP-MIP-OES i rejestrując synchroniczne sygnały pulsowe Se i Hg, Doktorantka znalazła korelację pomiędzy Se i Hg dla SeNP obecnych w analizowanych próbkach, potwierdzając tym samym, że w skład analizowanych NP wchodzi zarówno Se jak i Hg (rozdział 13). Potwierdziło to, że SeNP działają antagonistycznie w stosunku do związków Hg_n i Hg_o. W dalszej części pracy doktorskiej, Doktorantka użyła wspomnianej metody SP-MIP-OES do analizy oddziaływań białka ludzkiej albuminy (HSA) z SeNP. Podobnie jak poprzednio zostały użyte SeNP otrzymane z użyciem ekstraktu drożdży oraz ekstraktu drożdży i energii mikrofalowej. Zbadano również aktywność cytotoksyczną wspomnianych SeNP względem prawidłowych komórek szczurzej wątroby. Rejestrując synchroniczne sygnały pulsowe Se i C, Doktorantka potwierdziła, że na powierzchni SeNP zaadsorbowane zostało białko HSA. W badaniach tych wykazano również korelację występującą dla par pierwiastków Ca-Se i Na-Se. W przypadku korelacji Ca-Se stwierdzono dodatkowo zależność intensywności sygnałów od wielkości NP. Wyniki obu tych rozdziałów również uważam za bardzo ciekawe i warte kontynuowania, zważywszy, że pomiary pojedynczych cząstek metodami spektrometrycznymi wciąż

się rozwijają. Wyniki tych badań zostały opublikowane w czasopiśmie Monatshefte für Chemie, 151, 2020, 1283-1290.

Reasumując, w świetle obowiązujących przepisów (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. z 2017 roku, poz. 1789 z późniejszymi zmianami) w związku z art. 179 ustawy z dnia 13 lipca 2018 roku – Przepisy wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce) stwierdzam, że rozprawa pani mgr inż. Magdaleny Borowskiej spełnia wymogi formalne stawiane tego rodzaju pracom, tzn. stanowi oryginalne rozwiązanie ciekawego problemu naukowego, potwierdza jej wiedzę i umiejętności do samodzielnego prowadzenia pracy naukowej w naukach chemicznych.

Dołączone do pracy doktorskiej dokumenty nt. dorobku naukowego mgr inż. Borowskiej dobitnie wskazują, że jest bardzo pracowita i ambitna uczona. Mimo młodego wieku ma w swoim dorobku opublikowanych siedem artykułów w indeksowanych czasopismach z chemii analitycznej i spektrometrii atomowej o łącznym współczynniku oddziaływania wynoszącym 28,31. Jest również współautorką jednego artykułu w czasopiśmie popularnonaukowym i jednego rozdziału monograficznego w języku polskim. Liczba Jej różnych wystąpień konferencyjnych jest imponująca. Nie powinno zatem dziwić, że pani mgr inż. Borowska jest beneficjentką konkursu Preludium¹⁴ Narodowego Centrum Nauki, adresowanego do młodych adeptów nauki, jak również chętnie przyjmowana w innych ośrodkach naukowych na krótkoterminowe staże naukowe (ogółem dziewięć miesięcy, wszystkie staże w Instytucie Chemii Analitycznej i Fizycznej Środowiska i Materiałów w Pau we Francji). Dowodem uznania osiągnięć naukowych pani mgr inż. Borowskiej są również liczące się stypendia naukowe i projakościowe oraz nagrody naukowe. Dlatego wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pani mgr inż. Borowskiej.

Kierownik
Katedry Chemii Analitycznej
i Metalurgii Chemicznej

prof. dr hab. inż. Paweł Pohl