

Prof. dr hab. Stanisław Wysocki  
Instytut Podstaw Chemii Żywności  
Politechniki Łódzkiej

## RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Hetmańskiej

***„Zastosowanie UHPLC z detektorem PDA i emisyjnym do badania właściwości spektralnych i fotofizycznych 7-aminokumaryny, C120”.***

**Czy podjęta przez Doktorantkę tematyka jest jeszcze aktualna?**

Z pozoru mogło by się wydawać, że tego typu badania są badaniami rutynowymi, z którymi to mamy do czynienia w codziennej praktyce laboratoryjnej. A więc należy postawić pytanie, gdzie należy szukać aktualności tematu, dopatrywać się nowości naukowych?

Zazwyczaj badając właściwości spektralne związków chemicznych przyjmujemy, że zachowanie kształtu widma w zakresie stężeń od  $10e-7$  do  $10e-5$  jest dostatecznym dowodem na to, że jest to widmo pojedynczej cząsteczki w roztworze, widmo monomeru, spuszczamy zasłonę milczenia na procesy np. homodimeryzacji i możemy pospiesznie przystąpić do obliczeń kwantowo-mechanicznych.

Nie martwimy się o czystość rozpuszczalnika, gdyż za dobre pieniądze możemy kupić rozpuszczalnik o tzw. spektralnej czystości, do mniemając, że wszystkie zanieczyszczenia producent za nas usunął.

Natomiast Pan Promotor dokonał wyboru obiektu badań Doktorantce zapewne w sposób celowy i zamierzony tak, aby nie było łatwo i przyjemnie, 7-aminokumarynę, która to posiada zarówno grupę aminową, jak również karboksylową, obie zdolne do tworzenia wiązań wodorowych, skutkiem czego należało oczekiwać silnych oddziaływań pomiędzy cząsteczkami w roztworze, a tym samym bardzo dużej wartości stałej równowagi. To z kolei spowodowało, że Doktorantka została zmuszona do badań w zakresie stężeń poniżej  $10e-9$ , w którym to prawie, (poza rozpuszczalnikiem) nie ma „niczego”, więc „niczego” nie można zaniedbać.



Takie ustawienie zakresu badań pozwoliło Doktorantce na rewizję do tych czasowych ustaleń wiedzy o strukturze 7-aminokumaryny w roztworach, co bezpośrednio dowodzi aktualności przeprowadzonych przez nią badań.

### **Forma rozprawy doktorskiej.**

Tradycyjna forma pracy, a więc zawierająca takie rozdziały jak: przegląd literatury, zdefiniowanie celów pracy, aparatura i metodyka badań, czterech rozdziałów poświęconych omówieniu i dyskusji wyników badań eksperymentalnych, rozdziału prezentującego wyniki obliczeń teoretycznych wykonanych dzięki profesorowi Jackowi Koputowi oraz rozdziału prezentującego osiągnięcia uzyskane przez Doktorantkę kończącego się prezentacją wniosków.

Praca zawiera również streszczenia zarówno w języku polskim jak również w języku angielskim oraz wykaz literatury.

W końcowej części rozprawy Pani Magda zamieściła pełny tekst obszernego artykułu, w którym to jest pierwszym autorem „The application of a UHPLC system to study the formation of various chemical species by compounds undergoing efficient self-aggregation and to determine the homodimerization constants ( $K_{dm}$ ) with values in the high range of  $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ .” opublikowanego w RSC Advances, którego IF=3.049.

Należy więc uznać, że praca spełnia wymagania rozprawy doktorskiej stawiane przez ustawę o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami, szczególnie art.13 ust.2.

### **Czy Doktorantka zapoznała się z aktualnym stanem wiedzy w swojej dziedzinie?**

Omówienie dotychczasowego stanu wiedzy ma charakter zwięzłego, ascetycznego przeglądu danych literaturowych zawierającego ponad 100 pozycji dobranych starannie i przydatnych w dyskusji własnych rezultatów.

Tak więc, co do pozytywnej odpowiedzi na to pytanie, to nie mam najmniejszych wątpliwości, ponieważ zrealizowana przez nią praca jest konsekwencją żmudnej, dociekliwej analizy rezultatów badań



przedstawionych w dotychczasowej literaturze i krytycznego stosunku do otrzymanych rezultatów przez innych badaczy.

### **Czy wybór obiektu badań i dobór metod badawczych był właściwy?**

Wybrany obiekt badań była 7-aminokumaryna, C120 (7-amino-4-metylo-1,2-benzopiren) zakupiony w Applied Photophysics Ltd. O czystości > 99%. Rozpuszczalniki acetonitryl (ACN) oraz 1-chlorobutan miały czystość spełniające wymagania pomiarów HPLC (> 99.9%).

Widma absorpcyjne zostały wykonane z wykorzystaniem dwuwiązkowego spektrofotometru UV-Vis V-650 firmy Jasco, a widma emisyjne za pomocą spektrofluorymetru Fluorolog 3-22 (Jobin Yvon-Spex).

Podstawowym narzędziem pracy był ultrasprawy chromatograf ciekłowy firmy WATERS sprzężony z detektorem absorpcyjnym, jak również emisyjnym (co w przypadku badań prowadzonych przez Doktorantkę miał istotne znaczenie).

Rozdziałów dokonano na kolumnie typu Core-Shell Phenyl-Hexyl.

Zastosowanie materiałów o możliwie najwyższej czystości, oraz aparatury renomowanych firm gwarantowały poprawność i powtarzalność wyników lecz na nic by to się zdało gdyby niezwykle staranne podejście Pani Magdy do pracy, co wyraża się między innymi zaplanowaną sekwencją pomiarów od czystego rozpuszczalnika, przez stopniowe zwiększanie stężenia związku.

Ta staranność laboratoryjna Doktorantki jest gwarantem wiarygodności otrzymanych przez nią wyników, a ma to szczególnie istotne znaczenie w obszarze stężeni poniżej  $10^{-9}$ , w którym to przyszło Jej pracować.

Co się tyczy wyboru związku, będącego obiektem badań, to z przyczyn o których wspomniałem na początku, otwiera on nowy obszar badań umożliwiających wyznaczenie stałych homodimeryzacji o wartościach rzędu  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ .



## Czy Doktorantka osiągnęła cel pracy?

Wybór 7-aminokumaryny był zapewne inspiracją do poszukiwań metodyki badawczej wyznaczania stałych homodimeryzacji w tych przypadkach, kiedy jej wartość jest rzędu  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Już wstępne oszacowania przeprowadzone przez Doktorantkę doprowadziły ją do wniosku, że koniecznym będzie przeprowadzenie badań w zakresie bardzo małych stężeń, poniżej  $10^{-9} \text{ M}$ .

I w tych warunkach postawiła sobie za cel opracowanie metodyki badawczej umożliwiającej identyfikację obecnych w roztworze indywiduów takich jak homodimerów, kompleksów z cząsteczkami rozpuszczalnika, ich właściwości spektralnych oraz fotofizycznych mając do dyspozycji układ UHPLC-PDA-FL.

Konsekwentna, żmudna praca umożliwiła jej wyodrębnienie szeregu indywiduów tworzonych przez C120 w ACN takich jak monomer, trzy kompleksy monomeru z cząsteczkami rozpuszczalnika, dwa dimery i dwa kompleksy dimerów z cząsteczkami rozpuszczalnika.

Stwierdziła, że w zakresie stężeń  $10^{-6} - 10^{-4} \text{ M}$  C120 w ACN występuje niemal wyłącznie w postaci dimeru, a nie monomeru jak powszechnie sądzono. Wniosek ten został poparty obliczeniami teoretycznymi, rezultaty których potwierdziły bardzo dużą energię oddziaływania pomiędzy monomerami tworzącymi dimer.

Wyznaczyła właściwości spektralne wymienionych poprzednio indywiduów.

Do głównych osiągnięć Doktorantki należy zaliczyć wyznaczenia stałych równowagi homodimeryzacji C120, która to w acetonitrylu wynosiła  $K_a = 1.5 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ , natomiast w mniej polarnym rozpuszczalniku jakim był 1-chlorobutan  $K_a = 9 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1}$ .

Znacząca różnica tych stałych ilustruje silny wpływ rozpuszczalnika na proces homodimeryzacji.

Autorka udowodniła więc, że metodyka badawcza oparta na wykorzystaniu UHPLC-PDA-FL pozwala w sposób wiarygodny na wyznaczanie stałych równowagi homodimeryzacji w bardzo szerokim





zakresie sięgającym aż do  $K_a = 10e10M^{-1}$ , co znacząco rozszerzyła zakres naszych możliwości badawczych.

Cała procedura została opisana i opublikowana w obszernym artykule w RSC Advances, a więc została rozpowszechniona wśród społeczności międzynarodowej.

Tym samym nie mając wątpliwości mogę stwierdzić, że cele, które Doktorantka postawiła zostały w pełni przez nią osiągnięte.

### **Uwagi nie tyle krytyczne, co dyskusyjne.**

Na stronie 37 pracy Doktorantka przyjęła założenie „Dla monomeru przyjęto, na podstawie teorii ekscytonowej, że w maksimum długofalowego pasma w WA, molowy współczynnik absorpcji jest o połowę mniejszy niż dla dimeru” powołując się na pracę M. Kashy.

Czy Pani zdaniem założenie to zostało eksperymentalnie potwierdzone?

Na stronie 75 znalazłem informację „Najlepszą zgodność z wartością eksperymentalną otrzymano stosując do obliczeń metodę TDDFT, gdy użyto popularną bazę B3LYP.”

Czy rzeczywiście B3LYP jest bazą, a może funkcjonałem o charakterze hybrydowym?

Dlaczego Pani nie nakłoniła Profesora Koputa, aby popracował więcej, uzupełnił obliczenia o analizę wibracyjną i zamiast porzestania na wartości energii oddziaływania, obliczył energie swobodną Gibbsa, a Pani by to przeliczyła na wartość stałej równowagi homodimeryzacji?

Strona 76 „Wyniki tych obliczeń zarówno w fazie gazowej jak i w ACN dla M i DM zgadzają się bardzo dobrze z wynikami eksperymentalnymi.”

Czy w rzeczy samej były wykonane eksperymenty w fazie gazowej?

Mam nadzieję, że w trakcie obrony Doktorantka udzieli mi wyczerpujących odpowiedzi na postawione wyżej pytania.

### **Ocena strony redakcyjnej pracy.**

Pod względem stylistycznym praca jest napisana bardzo starannie. Kilka drobnych, niefortunnych sformułowań, zwykłych „literówek” jest bez znaczenia dla merytorycznej wartości pracy.

Poziom edytorski jest również dobry. Dobrze została opracowana strona graficzna pracy.



Pod tym względem praca przedstawiona mi do recenzji spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim.

### Konkluzja.

Na podstawie argumentów przedstawionych w poprzednich rozdziałach recenzji uważam, że przedstawiona mi do oceny rozprawa jest oryginalna, w której Autorka dowiodła, że potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe. Niezwykła staranność wykonywanych eksperymentów, pracowitość zaowocowały opracowaniem metodyki badawczej wyznaczenia stałych równowagi homodimeryzacji w zakresie  $10^5 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ , która to uzyskała akceptację międzynarodowego środowiska naukowego i zastała opublikowana w RCS Advances.

Poziom pracy należy uznać za wyróżniający.

Uważam więc, że praca spełnia wymagania rozprawy doktorskiej stawiane przez ustawę o tytule i stopniach naukowych z dnia 14 marca 2003 roku z późniejszymi zmianami, szczególnie art.13 ust.2 i stawiam wniosek do Wysokiej Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o nadanie stopnia doktora nauk chemicznych pani mgr Magdalenie Hetmańskiej.

Prof. dr hab. Stanisław Wysocki



