

Dr hab. inż. Jacek A. Soroka, prof. nadzw.
Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej
Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie

Szczecin, 28 września 2015 r.

Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. **Małgorzaty Wielgus** pod tytułem
*„Eksperymentalne badania dwufotonowych widm absorpcyjnych molekuł w roztworach:
solwatochromizm dwufotonowy”*,
wykonanej w Zakładzie Chemii Fizycznej i Kwantowej
Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej
pod kierunkiem prof. dr. hab. inż. Wojciecha Bartkowiaka.

Recenzowana praca, choć mieści się zaledwie na 130 stronach (+ 27 stron załączników i spisu cytowanej literatury) i napisana jest poprawnym językiem, wymagała bardzo dużej uwagi przy czytaniu, bowiem zawiera ogrom informacji, tak teoretycznych, jak i eksperymentalnych.

Układ pracy jest typowy: część teoretyczna - 30%, metodologia - 8%, badania własne - 32%. Resztę stanowią wstęp, spis oznaczeń, wykazy tabel i rysunków także charakterystyka wykorzystywanych rozpuszczalników. Spis literatury, adekwatny do planowanych badań, obejmuje 346 pozycji z lat 1878 (pierwsze wzmianki o solwatochromii) do 2015 (badanie absorpcji dwufotonowej). Szata graficzna jest przejrzysta, rysunki czytelne.

Nie trzeba nikogo przekonywać, że zagadnienia oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią są nie tylko ważne z punktu widzenia poznawczego, ale mają wpływ na wszelkie procesy życiowe a stopień ich celowego wykorzystania przez ludzi decyduje o jakości życia i warunkuje poziom rozwoju cywilizacyjnego. Ogólnie dostępne źródło tego promieniowania, to Słońce, będące w wielu kulturach uważane za Boga.

Celem pracy mgr inż. Małgorzaty Wielgus było przeprowadzenie własnych badań wybranych barwników o udokumentowanym solwatochromizmie, pod kątem absorpcji światła typu jednofotonowego (nazywanego w pracy absorpcją liniową) i wielofotonowego, w zamierzeniu dwufotonowego przy jednoczesnym zbadaniu wpływu na te procesy zmian stosowanych rozpuszczalników, uwidoczniających solwatochromizm badanych obiektów.

Praktycznym dalekosiężnym celem prowadzonych badań może być nowy wariant fotodynamicznej metody leczenia niektórych schorzeń. Dotychczasowe metody opierają się na stosowaniu odpowiednio dobranej długości fali światła (przestrajane lasery) wzbudzającej do stanu trypletowego barwnika kumulującego się w obszarze chorobowo zmienionym (np. guzie nowotworowym). Barwnikami takimi są najczęściej pochodne porfiryny (hematoporfiryna i jej chemicznie modyfikowane pochodne), zaś problem polega na tym, jak pomiędzy silnymi pasmami absorpcyjnymi hemoglobin (z krwi tętniczej i żyłnej) przemycić promieniowanie absorbowane głównie lub jedynie przez terapeutyczny barwnik - np.

porfiryne. Taki barwnik wzbudzony w krótkim czasie przechodzi ze stanu singletowego w trypletowy i wówczas kontaktując się z naturalnym tlenem (tlenem trypletowym) w wyniku procesu zwanego anihilacją trypletów generuje niezwykle aktywny i biotoksyczny tlen singletowy, uśmiercający swoje otoczenie, zatem i guz nowotworowy. Tak jest w idei, jednak w praktyce terapeutyczna pochodna porfiryny jest obecna także w zdrowych częściach organizmu, zaś częstotliwość dobranej promieniowania nie eliminuje w pełni jego absorpcji przez hemoglobiny. Po tym nieco przydługim wywodzie, chcę podkreślić, że zastosowaniu chwytu, jakim jest absorpcja dwufotonowa, może pomóc w skutecznej walce z niektórymi nowotworami, a to jest ważki argument za docenieniem pracy przedstawionej przez Autorkę, nie pomijając jej całego aspektu poznawczego.

We wczesnych latach 80. minionego wieku pojawiło się entuzjastycznie przyjęte nowe źródło promieniowania - przestrajany laser oparty na kryształach szafiru domieszkowanego tytanem. Wcześniej stosowano mało stabilne przestrajane lasery barwnikowe, w których najczęściej znajdowały się kłopotliwe w pracy roztwory. Prace z wykorzystaniem tego nowego, bardzo wydajnego i trwałego źródła doprowadziły do rozwoju metod impulsowych o nieznanym wcześniej długości impulsu, mieszczącej się w obszarze femtosekund. Ten nowy typ „lampy błyskowej” lub „stroboskopu” umożliwił obserwację podstawowych elementów reakcji chemicznych, zachowania pojedynczych atomów a nawet „sfotografowania” elektronu, czego dokonano na początku 2008 r. w Uniwersytecie w Lund, jednak już w attosekundowej domenie czasowej, rozwijanej od 2006 roku. Od czasu przyznania w 1999 r. nagrody Nobla profesorowi Achmedowi Zewail nastąpił lawinowy rozwój badań w obszarze krótkich domen czasowych. Jedynym problemem było zdobycie środków na zakup i uruchomienie instalacji z przestrajanymi laserami femtosekundowymi lub jeszcze szybszymi.

Autorka, jako obiekty badań wybrała trzy dobrze znane i badane barwniki: *p*-nitroanilinę (*p*NA), 4-dimetyloamino-4'-nitrostilben (DANS) oraz betainę Dimrotha-Reicharda (B30). Dla każdego z nich wykonała badania absorpcji jedno i dwufotonowej w seriach wybranych rozpuszczalników. Wyzaczyła maksima energii przejścia a także intensywności absorpcji (maksimum przekroju czynnego, zintegrowany współczynnik ekstynkcji a także siłę oscylatora).

Pomiarów dokonywała w instalacji typu Z-scan, zawierającej laser subpikosekundowy, wzmacniacz parametryczny (element przestrajający i skracający impulsy lasera), osłabiacz wiązki, zestaw luster, płytki światłodzielnące, detektory promieniowania, soczewki i szczeliny (pinhole). Idea pomiaru polegała na umiejscowieniu roztworu barwnika w miejscu zogniskowania wiązki lasera, co zapewniało możliwość uzyskania dowolnie krótkich odstępów czasowych pomiędzy kolejnymi fotonami padającego w wybrany element przestrzeni zawierający barwnik. Jeżeli odstęp czasowy jest porównywalny z czasem absorpcji (oddziaływania) pojedynczego fotonu (co wynika z jego długości fali), to obiekt może zaabsorbować oba, przy czym energia fotonów może się podwoić i wzbudzić przejście elektronowe dostępne dla absorpcji jednofotonowej fali dwukrotnie krótszej.

To, co teraz napisałem, jest krótkim podsumowaniem teorii kwantowych, których rozbudowany opis i dyskusję przedstawiła Autorka w recenzowanej pracy. Do tej części pracy nie będę się ustosunkowywał szczegółowo, ale dostrzegłem, że teoria przedstawiona jest wrywkowo, końcowe równania pojawiają się w formie gotowej, zaś nie wszystkie oznaczenia są wyjaśnione, a czasem tym samym symbolem oznaczono różne terminy, jak współczynnik pola lokalnego i grubość warstwy (str. 68).

W części przeglądowej Autorka zebrała informacje o wielu zbadanych już barwnikach. Na stronach 49 i 53 znajdują się między innymi wzory barwników 4 i 27, w których wielokrotność podstruktury wynosi „n”. Ponieważ są to konkretne zbadane związki (opisane w tabeli 2 – str. 37 i 40) należy podać, ile ta krotność w każdym z przypadków wyniosła. Autorka przedstawiła także źródła wykorzystywanych empirycznych skal polarności rozpuszczalników. Jedna ze struktur na rys. 7 str. 31 nie jest adekwatna do opisu.

W części dotyczącej stosowanej procedury, na str. 64 mowa jest o ewaluacji prowadzonej przy pomocy płytki kwarcowej o grubości 4.66 mm. Jeżeli nie była ona wykonana ze szkła kwarcowego, a kryształu należy podać orientację płaszczyzny cięcia w stosunku do jego osi.

Metoda wyznaczania siły oscylatora na podstawie widma wymaga całkowania pasma absorpcji w funkcji liczby falowej. Najpierw pasmo należy wydzielić, znajdując dla niego odpowiednią krzywą estymującą. Gdy widmo przedstawiane jest w funkcji długości fali, a tylko takie prezentowane są w pracy, nie uda się dopasować parametrów funkcji Gaussa, zatem i dokładniejsze całkowanie zawiedzie. Jak zatem całkowano?

Przy badaniach DANS zastosowano chloroform, dichlorometan i DMSO. Dwa z wymienionych są niewdzięcznymi rozpuszczalnikami: chloroform niestabilizowany alkoholem odszczepia chlorowodór, zaś DMSO jest ekstremalnie higroskopijny. Zastępując zwykły chloroform deuterowanym, który dzięki izotopowemu efektowi I-rzędu jest praktycznie trwały, posiada też bardzo zbliżoną polarność, uniknięto by potencjalnych artefaktów. Jak pracowano zatem z wymienionymi rozpuszczalnikami?

Wpływy rozpuszczalników na położenie (liczba falowa maksimum) i intensywność (dziesiąty molowy współczynnik ekstynkcji) najniższej energetycznego pasma DANS w funkcji polarności z dobrą dokładnością opisano równaniem czteroparametrowym, zawierającym parametry kwasowy SA, zasadowy SB, polaryzowalnościowy SP oraz dipolarnościowy SdP. Dla prezentacji skuteczności estymacji tym równaniem brakuje wykresu. Najprościej byłoby przedstawić wartość doświadczalną w funkcji wartości estymowanej. Przeprowadzona na str. 81-82 a także 90-91 dyskusja wpływu parametrów polarności rozpuszczalników jest niepoprawna. W przypadku parametru o bardzo małej zmienności odpowiedni współczynnik regresji może przyjąć duże wartości, co wcale nie oznacza dominującego wpływu określonej cechy rozpuszczalnika na badaną wielkość. Prawidłowa dyskusja powinna być poprzedzona normalizacją danego parametru do jego zmienności (pierwiastek z wariancji), lub poprzez pomnożenie uzyskanych w pracy współczynników regresji przez pierwiastek z wariancji. Dopiero po sprowadzeniu współczynników regresji do „wspólnego mianownika” w podany wyżej sposób możliwa jest dyskusja mająca sens fizyczny. Wartość parametru znormalizowaną do pierwiastka z wariancji dla każdego rozpuszczalnika można wyliczyć ze wzoru

$$p_{i,\text{norm}} = (p_i - p_{\text{ave}}) / [\sum (p_i - p_{\text{ave}})^2]^{1/2}$$

gdzie p_i oznacza wybrany parametr i -tego rozpuszczalnika, p_{ave} – średnią arytmetyczną tego parametru dla wszystkich rozpuszczalników, zaś indeks i zmienia się od 1 do ostatniego numeru rozpuszczalnika. Takie operacje normalizacyjne nie mają wpływu na jakość uzyskanych korelacji i ich ocenę statystyczną (współczynnik korelacji, odchylenie standardowe). Nie mogą zatem uznać proponowanej przez Autorkę interpretacji wyników i wpływających z niej wniosków. Autorka sama odkryła, że pojedyncza korelacja (rys. 83d) i

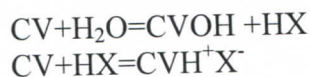
wieloparametrowa (równanie 51, str. 90) prowadzą do sprzecznych wniosków, bo i muszą, z powodów opisanych powyżej. Ta sama wada pojawia się na str. 106-107 przy „rozłożeniu na czynniki pierwsze” $E_T(30)$ i dalszej dyskusji.

Ponieważ w pracy nie ma czasami wyraźnego podziału na część literaturową i badania własne, zatem przy omawianiu badań poszczególnych barwników przytaczana jest jej krytyczna analiza. Na str. 87 znalazłem wzmiankę o badaniu *pNA* w nadkrytycznej wodzie i nadkrytycznych alkoholach, która mówi o zaobserwowanym przesunięciu batochromowym. Trzeba jednak zwrócić uwagę na temperaturę, w której musiano dokonać pomiarów. Dla wody to ponad 374 °C. Jak zatem wyglądało obsadzenie stanów oscylacyjnych? Jaka jest stabilność chemiczna w tych warunkach badanych obiektów? Te i być może inne elementy powinna Autorka wyeksponować w swoim tekście.

Przy doborze rozpuszczalników dla *pNA* znalazłem informację, że z powodu słabej rozpuszczalności należało wykluczyć chloroform i dichlorometan. Proste oszacowanie wykonane dla 1 mm warstwy i hipotetycznie wysokiej, acz możliwej do zmierzenia absorbancji 6, wskazują, że badany roztwór powinien zawierać około 0.5g *pNA* w litrze, co jest realne. Nie rozumiem zatem podanej argumentacji.

W dalszej części natknąłem się na dyskusję o polarności węglanu propylenu. Dysponując barwnikami wykorzystywanymi w tworzeniu skal polarności można samemu określić polarność TEGO SWOJEGO węglanu. Piszę to dużymi literami, ponieważ ponad 99% dostępnych rozpuszczalników zawiera zmienne ilości domieszek i nie powinno to nikogo dziwić. Nawet dostępna na rynku *via* Aldrich betaina Dimrotha-Reichardta zawiera jedynie 90% barwnika, zaś pochodzący z tego samego źródła fiolet krystaliczny ma deklarowaną czystość 95%. Autorka przy każdym z używanych barwników czy rozpuszczalników umieszczała informację, że nie prowadziła żadnych dodatkowych oczyszczeń. Z tego powodu w wynikach mogą pojawić się artefakty.

Na str. 117 znajduje się dyskusja dotycząca możliwości asocjacji fioletu krystalicznego z powierzchnią kuwety. To jest bardzo częste zjawisko, występuje prawie zawsze, choć widoczne jest głównie przy bardzo rozcieńczonych roztworach niektórych związków (szybki spadek stężenia) lub przy bardzo cienkich warstwach (ilość na ściankach jest porównywalna z ilością w roztworze pomiędzy nimi). W pobliżu ścianki roztwór przestaje być anizotropowy, zatem wszelkie wartości wyznaczone dla układów anizotropowych zaczynają się różnić od mierzonych w tych odmiennych warunkach. Wobec tego, czy opisane na str. 122 dodatkowe pasmo absorpcyjne fioletu krystalicznego, zlokalizowane przy 560 nm nie ma takiej przyczyny? Szukanie błędu w wadzie kuwety zupełnie mnie nie przekonuje. Ponadto na str. 120, rys. 120 Autorka przedstawiła widma fluorescencyjne fioletu krystalicznego zmierzone w kilku rozpuszczalnikach i przy różnych stężeniach. Zaskakuje fakt obserwacji fluorescencji przy krótszych falach (ok. 450 nm) niż główne pasmo absorpcyjne (ok. 600 nm). Normalna fluorescencja odbywa się pomiędzy stanami S_1 a S_0 , i prowadzi do emisji długofalowej. Z jakiego poziomu startuje tutaj? W opisie rysunku nie znalazłem informacji o długości fali wzbudzenia. Znane są liczne przypadki podobnych zachowań, np. w azulenie i jego heteroanalogach, ale nie w barwnikach tryfenylometanowych. Gdyby jednak dopuścić, że wykorzystywany w badaniach fiolet krystaliczny zawierał dwusól, zatem byłaby szansa, aby ten żółty+niebieski składnik był źródłem obserwowanej niebieskiej emisji. Taka dwusól (CVH^+X^-) mogłaby istnieć, jako domieszka lub tworzyć się w roztworze w reakcji wymiany np. z domieszką wody wg równań:



Na str. 123 opisane jest doświadczenie z użyciem ciężkiej wody, bowiem, jak napisano H_2O silnie absorbuje w obszarze koniecznym dla eksperymentu dwufotonowego. Uzyskana wartość przekroju czynnego jest dwukrotnie mniejsza od uzyskanego dla trzech innych rozpuszczalników (WP, DMF i DMSO). Moim zdaniem problem leży w zawartości H_2O i HOD w D_2O . Dostępna ciężka woda o 100% czystości izotopowej D naprawdę zawiera od 0.004 – 0.04 % atomowego wodoru, co oznacza stężenie lekkiej lub „obciążonej” (HOD) wody 0.11 do 2.2 mol/L. Z punktu widzenia spektrometrii UV-VIS są to bardzo duże stężenia i w nich upatruję wyniku zaznaczonego na czerwono w tabeli 18.

Na str. 26 i 27 opisany jest tzw. *inverted solvatochromism* i odniesiony do betainy Leslie G. Brooker (kobieta, mężczyzna?). Ten typ zmiennej solwatochromii wykazuje większość merocyjanin, w tym dziesiątki zbadanych i opisanych przez mój zespół (model VBHB), nie cytowany w pracy.

Za najbardziej intrygujące dokonanie naukowe uważam odkrycie w warunkach eksperymentu dwufotonowego nowego pasma krótkofalowego betainy Dimrotha-Reicharda leżącego ok. 970 nm (str. 108-109) oraz sugestię, że wynika ono ze wzbudzenia startującego z „ciemnego” stanu. To zagadnienie wymaga głębszych badań (manipulacja czasem trwania impulsów lasera itp.) i może dużo wnieść do naszej wiedzy o strukturach elektronowych barwników.

W pracy są liczne błędy edytorskie, szczególnie dotyczące nazewnictwa związków chemicznych. Jeden z nich jest na str. 101. Jest to niezręczne tłumaczenie z angielskiego. Na str. 29 znalazłem bardzo sympatyczny neologizm „uprotonowanie” zamiast sprotonowanie. Na str. 20 znajduje się angielskojęzyczne zdanie przypisywane Arystotelesowi. Nie przypuszczałem, że to On stworzył podwaliny tego języka. Drobnych pomyłek jest jeszcze kilka (str. 70 – brak znaku minus w strukturze, nazwanie izomerów geometrycznych *cis* i *trans* – konformerami, str. 72 – miano współczynnika ekstynkcji molowej, itp.), ale nie mają one żadnego wpływu na moją wysoką ocenę recenzowanej pracy.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Małgorzaty Wielgus, zgodnie z rozporządzeniem MNiSW z dnia 15 stycznia 2004 (Dz.U. z 2004 r. nr 15 poz. 128 z późniejszymi zmianami) oraz art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. z 2003 r., nr 65 poz. 595 z późniejszymi zmianami) w pełni odpowiada wymogom określonym przez wyżej wymienione ustawy. Wnioskuje zatem o przyjęcie i dopuszczenie Pani mgr inż. Małgorzaty Wielgus do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc ponadto pod uwagę ogrom pracy Pani mgr inż. Małgorzaty Wielgus, tak eksperymentalnej, jak i wymagającej zaangażowania intelektu, a także współautorstwa co najmniej trzech publikacji o wysokich notowaniach i wielokrotnie już cytowanych wnoszę o wyróżnienie tej pracy.

Jacek Adam Soroka