Poznań, 25.07.2017

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Magdaleny Słowik – Borowiec pt. „Analityka i kinetyka rozkładu pozostałości środków ochrony roślin w materiale roślinnym o dużej zawartości chlorofilu". Praca została wykonana w Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin w Rzeszowie, Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu pod kierunkiem dr hab. inż. Ewy Szpyrki. W pracy promotorem pomocniczym był dr Dariusz Drożdżyński.

Z uwagi na rozpowszechnienie środków ochrony roślin, ich toksyczny charakter i dużą liczbę stosowanych preparatów, badanie pozostałości środków ochrony roślin jest jednym z głównych obszarów analityki żywności. Różnorodność stosowanych związków, złożoność matrycy jaką są rośliny i żywność w których bada się pozostałości środków ochrony powodują, że analityka pozostałości pestycydów jest bardzo skomplikowanym i wymagającym zagadnieniem. Konieczność badania pozostałości pestycydów przyczyniła się do rozwoju chemii analitycznej poprzez odkrycie nowych metod detekcji w chromatografii (detektor wychwytu elektronów, ECD), postęp w produkcji kolumn kapilarnych, oraz opracowanie nowych procedur oczyszczania próbek (dSPE, QuEChERS). Metoda przygotowania próbek QuEChERS, oparta na dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej jako temat w wyszukiwarce Web of Science daje ponad 2050 rekordów (publikacji), co biorąc pod uwagę datę pierwszej publikacji w której opisano w/w metodę (2003) stawia ją jako jedną z najbardziej rozpowszechnionych metod, szczególnie w analizie pozostałości pestycydów, a ostatnio także innych grup związków (np. mikotoksyn, WWA). Oczyszczanie próbek jest kluczowym elementem procesu analitycznego przy badaniu pozostałości pestycydów, nawet przy zastosowaniu selektywnych metod detekcji. Niniejsza praca doktorska wpisuje się w opracowania dotyczące przygotowania próbek dla specyficznego składu matrycy do oznaczania pozostałości środków ochrony roślin.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska ma formę kompilacji 5 oryginalnych prac twórczych, jednorodnych tematycznie, opublikowanych w czasopismach z listy JCR. Prace te dotyczą oznaczania pozostałości pestycydów w świeżych liściach mięty z przygotowaniem próbek metodą QuEChERS (Publikacja 1) oraz badaniem efektów matrycy w tym materiale (Publikacja 3). Dotyczą także badania zawartości i kinetyki rozkładu środków ochrony roślin

w gorczycy białej (Prace 2 i 5) oraz oznaczania pozostałości środków ochrony roślin w koprze ogrodowym (Publikacja 4). We wszystkich publikacjach techniką separacyjną była chromatografia gazowa z detekcją wykorzystującą detektor wychwytu elektronów (ECD) i azotowo - fosforowy (NPD).

Praca doktorska obejmuje 44 strony części opisowej na które składają się: 2-stronicowe wprowadzenie, cel i zakres pracy, 12-stronicowa część poświęcona metodyce badań i materiałom wykorzystywanym w pracy, 6-stronicowe syntetyczne omówienie wyników, 5-stronicowa dyskusja, a także podsumowanie i wnioski oraz spis literatury obejmujący 75 pozycji, z czego 54 w języku angielskim. Oprócz części opisowej na pracę składają się załączniki. Załącznik I to kopie publikacji (ogółem 50 stron), załącznik II to oświadczenia współautorów prac, III to tytuły komunikatów przedstawianych na konferencjach naukowych oraz załącznik IV – spis badanych substancji czynnych z podanymi wzorami sumarycznymi i strukturalnymi.

Praca praktycznie pozbawiona jest części teoretycznej (literaturowej), w której opisano by kontekst pracy, dotychczasowy stan badań nad pestycydami będącymi przedmiotem zainteresowania doktorantki oraz oznaczaniem tych związków w matrycach podobnych jak badane w pracy. W sytuacji, gdy w skład prac zamieszczonych w doktoracie nie wchodzi praca przeglądowa, ograniczenie części literaturowej do 2-stronicowego wprowadzenia uważam za wadę rozprawy. W pracach, które są zbiorem publikacji, stanowią one zazwyczaj część wynikową pracy, a część literaturowa jest z reguły zamieszczana, co pozwala na określenie jak prace opublikowane przez doktoranta/doktorantkę mają się do aktualnego stanu wiedzy w danym obszarze.

Praca wpisuje się w badania nad wyborem najlepszych warunków ekstrakcji i oczyszczania pozostałości środków ochrony roślin w matrycach sprawiających trudności analityczne z uwagi na znaczną ilość pigmentów lub innych substancji interferujących z analitami. Do analizy wybrano surowce zielarskie, takie jak mięta i koper oraz gorczycę białą. O ile optymalizacja (wybór najlepszych warunków) ekstrakcji jest celem większości publikowanych prac metodycznych, dotyczących badania pozostałości pestycydów w materiale roślinnym i żywności, to za równie intersujący element rozprawy uważam wykorzystanie opracowanych metod do oceny kinetyki zanikania wybranych substancji czynnych środków ochrony roślin. Opracowanie metod analizy pozostałości środków ochrony roślin prowadzone było pod kątem wykorzystania do ich identyfikacji i kwantyfikacji detektorów ECD i NPD, których wykorzystanie w analityce pestycydów będzie tracić na znaczeniu wraz z rozpowszechnieniem spektrometrów mas jako detektorów. Można się spodziewać, że nowsze metody detekcji - głównie tandemowa spektrometria mas pozwoliłyby na osiągnięcie lepszych efektów (głównie jeśli chodzi o granice wykrywalności i oznaczalności). Podjęcie

wyartykułowanego w celu pracy tematu uważam za bardzo zasadne, głównie z uwagi na małe wymagania sprzętowe dla opracowanych metod.

Metodyka przygotowania próbek wybrana przez doktorantkę opierała się na wykorzystaniu metody QuEChERS opracowanej przez Anastassiadesa, Lehotaya oraz współpracowników i będącą w chwili obecnej najczęściej wykorzystywaną metodą przygotowania próbek w analizie pozostałości pestycydów. Metoda ta wykorzystuje ekstrakcję analitów acetonitrylem, z wykorzystaniem sorbentów i soli do usuwania zanieczyszczeń i oparta jest obecnie na zestawach do ekstrakcji produkowanych przez wiele firm. W niniejszej pracy autorka posługiwała się zestawami SampliQ firmy Agilent Technologies. Optymalizacja metody oryginalnej mająca na celu dobór najlepszych parametrów ekstrakcji dla badanych roślin przy narzuconych warunkach detekcji (ECD/NPD) polegała na doborze wielkości naważki, ilości dodanej przed ekstrakcją wody oraz zmianie rozpuszczalnika. Efektywność oczyszczania analitu badano poprzez odpowiedni dobór mieszanin trzech sorbentów – PSA (amin pierwszo i drugorzędowych), GCB (węgla aktywnego) oraz żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami oktadecylowymi (C18). Oprócz dyspersyjnej SPE, czym w rzeczywistości jest metoda QuEChERS, wykorzystywano także w optymalizacji procesu izolacji analitów ekstrakcję ciecz/ciecz (LLE). Wybór kolumny w prowadzonych oznaczeniach pozostałości pestycydów z reguły sprowadza się do wykorzystania do tego celu kolumny niepolarnej (o fazie typu DB-5) oraz umiarkowanie polarnej (o fazie typu DB 1701) i takie też kolumny wykorzystała doktorantka w swoich badaniach (w opisie kolumny niepolarnej powinno być HP-5 MS, a nie HP-05 MS). Taki zestaw kolumn zalecany jest dla zwiększenia prawdopodobieństwa poprawnej identyfikacji związków poprzez uniknięcie koelucji, zwłaszcza jeśli do dyspozycji analityk ma wyłącznie detektory selektywne (ECD/NPD), a nie spektrometr mas. W części opisującej metodykę badań można było podać ile lat miał wykorzystywany detektor ECD (z uwagi na dość krótki czas połowicznego rozpadu niklu ^{63}Ni) i czy był to detektor typu ECD czy µECD. Nie podano także typu wkładki dozownika (linera) stosowanego w badaniach oraz częstotliwości jego wymiany i metod oceny jego stopnia zabrudzenia.

Istotnym elementem każdej publikacji była walidacja metody ujęta w planie eksperymentów, która obejmowała wyznaczenia wybranych parametrów metody: granicy oznaczalności, powtarzalności (RSD %), dokładności, odzysku, liniowości i zakresu roboczego. Oszacowano także niepewność metody i efekty matrycowe. Ważnym elementem potwierdzenia jakości badań było poddanie zoptymalizowanej metody niezależnej kontroli w międzynarodowych testach biegłości (EUPT-FV-18) dla szpinaku (spełniającego kryterium roślin o dużej zawartości chlorofilu).

Ciekawym elementem pracy są doświadczenia polowe prowadzone w latach 2013-2014 na gorczycy białej w ODR w Boguchwale (woj. podkarpackei) do badania stopnia zaniku wybranych środków ochrony roślin. Doświadczenia polowe wykonywano zgodnie ze standardami dla tego typu eksperymentów, za pomocą układu bloków losowanych w 4 powtórzeniach.

Część wynikowa pracy doktorskiej obejmuje 5 publikacji zamieszczonych w czasopismach o IF w zakresie od 1.105 do 4.025 i punktacji MNiSW od 15 do 40 pkt, łącznie 135 pkt, (*Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, Food Chemistry, Food Analytical Methods (2 prace) i Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes*). Prace te zostały zrecenzowane na etapie przyjęcia do druku, a zamieszczenie ich w w/w czasopismach świadczy o ich jakości i oryginalności. Sumaryczne podsumowanie rezultatów osiągniętych w w/w pracach zostało w sposób syntetyczny i wyczerpujący przedstawione w części opisowej pracy poświęconej wynikom badań i ich dyskusji. Podsumowanie wyników badań zamieszczone w pracy uważam za bardzo dobrze napisane.

W mojej opinii dość niecodzienną praktyką jest współautorstwo promotora pracy doktorskiej tylko w 2 na 5 publikacji. Wskazywałoby to na ograniczoną rolę promotora w realizacji badań. Jeszcze mniej zrozumiałym dla mnie faktem jest nieobecność promotora pomocniczego w gronie autorów opublikowanych prac. Można się zastanawiać jaka była rola promotora pomocniczego w realizacji pracy doktorskiej, skoro nie został on ujęty jako współautor żadnej z publikacji.

Część wynikowa pracy obejmuje podsumowanie wyników otrzymanych w trakcie realizacji badań opisanych w 5 publikacjach:

Publikacja nr 1 dotyczy oznaczania pozostałości pestycydów w liściach mięty. Jak pisze autorka wybór metody detekcji związany jest z kosztem klasycznych w analizie pestycydów detektorów (ECD/NPD), które z wykorzystaniem zmodyfikowanej metody QuEChERS mogą być ekonomiczną alternatywą wobec spektrometrów mas. Zestaw wykorzystanych detektorów był używany przez innych autorów do oznaczania pozostałości pestycydów w różnych produktach, owocach i warzywach (ciecierzyca, żeń-szeń, oberżyna, odżywki dla niemowląt), nie był natomiast wykorzystywany w połączeniu z QuEChERS do oznaczania pestycydów w liściach mięty. W publikacji przedmiotem oznaczenia było 14 pozostałości środków ochrony roślin (8 insekcydów, 4 herbicydy, 2 fungicydy). Opracowana metoda pozwoliła na oznaczenie badanych związków w zakresie od 0.01 do 1mg/kg, a przedstawione chromatogramy wskazują na dobry stopień oczyszczenia próbek i zadawalającą selektywność w detekcji badanych związków biorąc pod uwagę złożoność matrycy bogatej w chlorofil i olejki eteryczne. W porównaniu do poprzednio opisywanej przez

autorów metody przygotowania próbek osiągnięto 30-krotne zmniejszenie ilości rozpuszczalnika i rezygnację z chloroformu/acetonu.

W pracy nr 2, opublikowanej w czasopiśmie *Food Chemistry* przedmiotem oznaczenia było 51 pestycydów w gorczycy białej. Gorczyca stanowi wymagającą ze względów analitycznych matrycę o dużej zawartości chlorofilu, a ponadto białka i tłuszczu, stąd konieczność doboru sorbentów pod określone grupy zanieczyszczeń. Sposób przygotowania próbek był w jednym wariancie identyczny jak w pracy 1, porównano ten wariant z dwoma innymi o różnych proporcjach sorbentów. Publikacja jest bardzo dobrze przygotowana pod względem metodycznym, dla wszystkich analizowanych związków określono podstawowe parametry metody – zakres liniowości, równania krzywych standardowych, odzyski przy trzech poziomach wzbogacania próbki analitami, współczynnik determinacji, rozszerzoną niepewność pomiaru. Dla 48 z 51 związków uzyskano satysfakcjonujące parametry walidacyjne w odniesieniu do kryteriów SANCO. Dodatkowo dla wybranych substancji czynnych preparatów przeprowadzono monitorowanie ich zaniku w czasie 90 dni po aplikacji.

Publikacja 3 dotyczy oznaczania 46 pestycydów w świeżej mięcie i ma podobny schemat eksperymentu podstawowego oraz część metodyczną jak poprzednie prace. Dodatkowo w pracy tej zbadano efekty matrycy dla wybranych analitów. W procedurze wyboru sorbentów kierowano się, jak w poprzednich pracach, ich powinowactwem do różnych grup zanieczyszczeń (składników matrycy) mogących interferować w procesie oznaczania analitów. Podobnie jak w poprzednich pracach w tej także dużą rolę autorka przywiązywała do aspektów walidacyjnych metody, a ocenę efektu matrycy i zróżnicowanie w obrębie badanych związków poprzez porównanie krzywych standardowych przygotowanych w rozpuszczalniku i matrycy uważam za cenny element publikacji.

W publikacji 4 doktorantka porównała trzy metody ekstrakcji (dyspersyjną SPE, połączenie dSPE i ekstrakcji ciecz - ciecz, oraz wyłącznie ekstrakcję ciecz – ciecz) do oczyszczania pozostałości 22 środków ochrony roślin w koprze ogrodowym. Do dSPE wykorzystano sorbenty analogiczne jak w poprzednich pracach, stosując też podobne modyfikacje (wielkość próbki, dodatek wody, zmiana acetonitrylu na eter naftowy przed analizą). Publikacja zawiera podobnie jak pozostałe szczegółowe parametry walidacyjne dla opracowanej metody, w tym, podobnie jak w pracy nr 3 określono dla podstawowego wariantu ekstrakcji efekty matrycowe porównując współczynniki nachylenia krzywych kalibracyjnych (wzorcowania) w matrycy i rozpuszczalniku. Dla wszystkich wariantów ekstrakcji określono odzyski. Od strony edytorskiej piki na chromatogramach (Fig. 1 i Fig. 2) powinny być opisane (jeśli są to chromatogramy wzbogaconych ekstraktów – a tylko takie pozwalają na ocenę czystości ekstraktów), oś czasu w Fig. 1 powinna obejmować tylko czas w którym następuje elucja pików (do 30 min.) by poprawić ich czytelność.

Publikacja 5 dotyczy kinetyki rozkładu dwóch insekcydów pyretroidowych – alfa-cypermetryny i lambda-cyhalotryny wchodzących w skład środków ochrony roślin w

częściach nadziemnych gorczycy białej w okresie do 3 tygodni po ich aplikacji. Eksperyment powtórzono w dwóch kolejnych latach, a do oznaczenia zawartości badanych związków wykorzystano opracowaną metodę (Publikacja 2) oczyszczania i analizy pozostałości środków ochrony roślin. Praca nie ma charakteru pracy metodycznej, ale stanowi wartościowe uzupełnienie publikacji 2, a charakter pracy ma odzwierciedlenie w tytule rozprawy doktorskiej.

Wszystkie prace ujęte w rozprawie doktorskiej opierają się na detekcji za pomocą detektorów ECD i NPD oraz kwantyfikacji opartej na krzywych kalibracyjnych wykonanych dla ekstraktu z matrycy. Jak wskazują efekty matrycowe postępowanie to jest jak najbardziej uzasadnione. Dla tego typu analiz, opartych na kalibracji zewnętrznej, w mojej opinii zasadne byłoby wprowadzenie bądź to do próbki, bądź do ekstraktu (lub na obu etapach) substancji, która pozwalałaby na monitorowanie pracy aparatu, głównie objętości nastrzyku, czystości wkładki dozownika (linera), a nawet detektora.

Niewątpliwą zaletą opublikowanych prac jest osiągnięcie dobrych parametrów analitycznych i spełnienie wymogów walidacyjnych dla pozostałości środków ochrony roślin oznaczanych w trudnych analitycznie matrycach – o dużej zawartości substancji interferujących – chlorofilu, tłuszczu czy olejków eterycznych. Metody te zostały opracowane dla najmniej skomplikowanego i najtańszego układu analitycznego, na który składa się para kolumn o zróżnicowanej polarności, połączona z dozownikiem za pomocą łącznika Y oraz z dwoma detektorami – ECD i NPD. Powyższa konfiguracja pozwala na oszczędność czasu analizy (równoczesne zbieranie sygnałów), przy satysfakcjonujących poziomach detekcji, selektywność oznaczeń i niskim koszcie (za sprawą relatywnie tanich detektorów w porównaniu z MS). Ten ostatni czynnik powoduje, że metody te mogą być wykorzystane w słabiej wyposażonych aparaturowo laboratoriach.

Prace wchodzące w skład rozprawy doktorskiej cechują się bardzo starannym podejściem analitycznym, spełniają wszystkie kryteria prac metodycznych. Obiektem zainteresowania zazwyczaj była znaczna liczba oznaczanych substancji (do 51 związków), co dodatkowo podnosi ich wartość naukową. Nie są może to prace bardzo nowatorskie, ale w każdej element nowości naukowej można znaleźć, z pewnością jeśli chodzi o wybór matrycy i sposób doboru sorbentów i rozpuszczalników do określonych matryc. Niewątpliwie stanowią wartościowy wkład w analitykę pozostałości środków ochrony roślin.

Doktorantka wykazała się bardzo dużą samodzielnością, znajomością warsztatu analitycznego, opanowaniem chromatografii gazowej z detektorami selektywnymi, a także bardzo dobrym przygotowaniem do oceny parametrów i walidacji metod analitycznych. Publikacje na których oparta jest praca są zarówno dobrymi pracami naukowymi, jak i

pracami posiadającymi duże znaczenie praktyczne z uwagi na prostotę procesu przygotowania próbek i niewielkie wymagania instrumentalne. Opracowane przez doktorantkę metody zostały zweryfikowane dla wybranych związków w badaniach biegłości EUPT-FV-18.

Stwierdzam, że oceniana przez mnie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Słowik – Borowiec do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń