

Dr hab. inż. Marek Łukasz Roszko, prof. IBPRS  
Zakład Bezpieczeństwa i Analizy Chemicznej Żywności  
Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno – Spożywczego  
im. prof. Wacława Dąbrowskiego w Warszawie  
Państwowy Instytut Badawczy

Warszawa, 07.06.2021

## Recenzja

Rozprawy doktorskiej autorstwa Pani mgr Ewy Rutkowskiej, pt. „Efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin” wykonanej pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Bożeny Łozowieckiej oraz dr hab. Piotra Kaczyńskiego prof. IOR-PIB w Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku - Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego.

Żywności poza dostarczaniem do organizmu człowieka niezbędny do życia składników odżywczych jest niestety również źródłem szeregu substancji niepożądanych i często wykazujących działanie szkodliwe. Związki chemiczne obce dla organizmów żywych są często w literaturze tematu określane jako ksenobiotyki. Obecność ksenobiotyków w żywności jest konsekwencją powszechnej ich obecności środowisku, ale również syntezy w trakcie procesów przetwórczych żywności, migracji z materiałów opakowaniowych i in. Ksenobiotyki emitowane są zarówno ze źródeł antropogenicznych jak i naturalnych. Chroniczne narażenie na szeroką gamę ksenobiotyków jest typowe dla populacji generalnej. Bardzo często żywność stanowi główne a nie źródło narażenia. Struktura źródeł narażenia z przewagą pobrania wraz z dietą jest charakterystyczna dla większości trwałych zanieczyszczeń organicznych, mikotoksyn, metali ciężkich czy też pozostałości środków ochrony roślin.

Problematyka występowania pozostałości środków ochrony roślin w żywności oraz surowcach rolnych jest niezwykle aktualna. Wszystkie wiodące ośrodki naukowe na świecie podejmują prace w zakresie rozwiązywania problemów agrotechnicznych stosowania środków ochrony roślin zarówno w ramach rolnictwa konwencjonalnego, integrowanego czy nawet ekologicznego. Prowadzone są bardzo liczne prace w zakresie toksykologii i chemii środków ochrony roślin. Nowo zdobywana wiedza wymusza bardzo silne zmiany w zakresie prawnych regulacji stosowania środków ochrony roślin, maksymalnych dopuszczalnych pozostałości czy też rejestracji substancji aktywnych i samych preparatów przeznaczonych do stosowania w rolnictwie. Jednym z często obecnie podejmowanych problemów jest również skumulowane działanie toksyczne różnych substancji chemicznych, w tym substancji aktywnych środków ochrony na organizm człowieka, w tym także ich działanie hormonalnie aktywne. Znajduje to

między innymi odzwierciedlenie w metodykach oceny ryzyka zdrowotnego przyjętych i stosowanych przez Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności.

Z punktu widzenia problematyki badawczej podejmowanej w zakresie pozostałości środków ochrony roślin w żywności, kluczowym elementem są zagadnienia z zakresu metrologii pomiarów oraz aspektów analitycznych oznaczania substancji aktywnych z złożonych matrycach żywnościowych. Powyższe, ma nie tylko istotne znaczenia z punktu widzenia konieczności dostarczania wiarygodnych danych analitycznych na potrzeby prowadzenia prac badawczych, ale również z uwagi na rutynowo wykonywane prace laboratoriów realizujących zadania z zakresu urzędowej kontroli żywności, czy też laboratoriów badających surowce i żywność kierowane na eksport. Bezpieczeństwo żywności oraz łagodzenie ryzyka w międzynarodowym obrocie towarowym żywnością i surowcami rolnymi są jednymi z kluczowych elementów licznych strategii krajowych jak i Unii Europejskiej. Istota problemów analitycznych związanych z badaniem pozostałości substancji aktywnych środków ochrony roślin wynika z liczebności różnych związków chemicznych, których oznaczenie jest konieczne często w jednym przebiegu analitycznym i jednej procedurze badawczej oraz złożoności matrycy żywności. Brak jest również możliwości stosowania specyficznych metod wyodrębniania analitów z matrycy i ich selektywnego oczyszczania z uwagi na różnorodność klas chemicznych substancji stanowiących oznaczane substancje aktywne.

#### **Ocena formalna pracy.**

Problematyka rozprawy doktorskiej Pani mgr Ewy Rutkowskiej skupiona jest na zagadnieniu tzw. efektu matrycy obserwowanego w analizie chromatograficznej i/lub spektrometrii mas.

Oceniana dysertacja mgr Ewy Rutkowskiej jest skonstruowana w sposób nie odbiegający pod względem formalnym od schematu przyjętego dla prac doktorskich. Praca obejmuje 74 strony maszynopisu, w tym 6 tabel oraz 5 rysunków. Dodatkowo w skład pracy wchodzi 4 publikacje wskazane jako jednotematyczny cykl będący przedmiotem rozprawy doktorskiej w sposób przejrzysty dokumentujące przeprowadzone prace eksperymentalne. Zwraca uwagę, że 2 spośród wskazanych prac zostały opublikowane w czasopismach z wysokim współczynnikiem oddziaływania, w tym m.in. prestiżowe Food Chemistry (IF ponad 6) zgodnie z rokiem opublikowania. Udział doktorantki w powstaniu publikacji wg oświadczeń autorki i współautorów wynosi 80 – 85 %.

Dysertacja składa się z 10 głównych rozdziałów oraz załączników. Praca w zdecydowanej części napisana jest w sposób jasny i zrozumiały. Łączna liczba cytowanych opracowań w dysertacji oraz monotematycznym cyklu publikacji obejmuje kilkaset pozycji literaturowych, w tym z ostatnich lat. Wyniki w ocenie recenzenta są oryginalne i generalnie opracowane z zastosowaniem odpowiednich metod analitycznych i statystycznych.

Przegląd literatury stanowi zwięzłe i przejrzyste opracowanie, w którym autorka poza przedstawieniem podstawowego badawczego problemu metrologicznego, przedstawia również aktualne dane z zakresu możliwości redukcji efektów matrycy lub ograniczania jego wpływu na wyniki pomiarów analitycznych w tym w kontekście obecnie obowiązującego prawodawstwa Unii Europejskiej i dokumentów normatywnych.

Dalsze rozdziały pracy zostały opracowane w oparciu o wcześniej opublikowane dane w ramach monotematycznego cyklu publikacji.

### **Ocena merytoryczna pracy.**

Autorka w pracy postawiła hipotezę badawczą, że zoptymalizowane strategie etapu przygotowania próbki materiału roślinnego i środowiskowego do badań wielu pozostałości ś.o.r. oraz etapu analizy instrumentalnej wpłyną na efekt matrycy. Ponadto autorka wskazuje, że efekt matrycy powiązany będzie z właściwościami fizyko-chemicznymi badanych analitów oraz metodami detekcji. W celu weryfikacji tak postawionej hipotezy autorka przeprowadziła szereg badań opisanych w szczególności w czterech przytaczanych publikacjach, których tytuły właściwie odzwierciedlają ich treść:

1. Influence of Quechers modification on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD.
2. Modification of multiresidue Quechers protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination of pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS.
3. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrix using gas chromatography tandem mass spectrometry.
4. Compensation of matrix effects in seed matrices followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues.

W części doświadczalnej scharakteryzowano materiał badawczy oraz omówiono metody badań. Badania zgodnie z tytułami publikacji prowadzono na próbkach gleby, suszonych ziół, nasionach różnych gatunków roślin oraz suszonych owocach.

Efekt matrycy jest definiowany, jak wskazuje Autorka jako obserwowane wzmocnienie lub tłumienie sygnału analitycznego w obecności składników matrycy. Obrazowo można powyższy problem przedstawić jako obserwowany zmieniony sygnał analityczny (np. powierzchnia pików chromatograficznych) obserwowany dla roztworów wzorcowych badanych substancji wprowadzanych do układu chromatograficznego w roztworach złożonych z czystych rozpuszczalnikach w odniesieniu do roztwór wzorców rozpuszczonych w rozpuszczalnikach w obecności badanej matrycy. W taki sposób problem przedstawia Autorka w swojej dysertacji oraz takie podejście jest szeroko stosowane w

literaturze tematu. W tym miejscu należy wyraźnie podkreślić, że tak skonstruowana definicja nie obejmuje trudności analitycznych wynikających z obecności interferencji chromatograficznych uniemożliwiających poprawną interpretację chromatogramów. Problem efektu matrycy wynika w przypadku chromatografii gazowej głównie lub wyłącznie z różnicy „zachowania się” analitów – innej ich absorpcji czy degradacji w momencie dozowania do układu chromatograficznego a także w początkowym fragmencie kolumny chromatograficznej. Powyższe informacje Autorka również dyskutuje w swojej dysertacji. Często obserwowanym zjawiskiem jest również zmienionej szerokości pasm chromatograficznych i kształty pików chromatograficznych na skutek blokowania miejsc aktywnych obecnych w kolumnie lub całym układzie chromatograficznym lub tzw. efektu rozpuszczalnika, kondensującego na czole kolumny. W odróżnieniu do chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, gdzie najczęściej nie zachodzi do zaburzania procesu jonizacji w źródle jonów, w chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas efekt matrycy ma najczęściej zupełnie inne podłoże wynikające z interakcji składników matrycy z analitami w trakcie jonizacji, w mniejszym lub minimalnym stopniu wynikającym ze zjawisk chromatograficznych.

W celu weryfikacji przyjętej w pracy hipotezy badawczej autorka podjęła realizację szeregu prac obejmujących modyfikację m.in:

- a) sposobu przygotowania próbki do badań w celu eliminacji substancji interferujących;
- b) uzyskanie efektu matrycy w rozpuszczalnikach stosując tzw. substancje ochronne lub kalibrację w matrycy;
- c) weryfikację wpływu stosowanych modyfikacji na podstawowe parametry statystyczne metody.

W opinii recenzenta stosowanie substancji ochronnych lub kalibracji w matrycy nie wpływa na efekt matrycy (zgodnie z przyjętą definicją), w zasadzie ma na celu wywołanie tego efektu (związanie miejsc aktywnych), w celu eliminacji systematycznych błędów analitycznych. Powstający efekt matrycy niweluje niedoskonałości układu chromatograficznego, najczęściej korzystnie wpływając na parametry metody np. w odniesieniu do uzyskiwanej granicy oznaczalności. Stąd też, realizowane w tym zakresie prace trudno określić jako badające efekt matrycy, chociaż niewątpliwie istotne z punktu widzenia dokładności metod analitycznych.

W tym miejscu należy również poddać dyskusji dlaczego autorka porównuje w kontekście analizy efektów matrycy różne układy detekcyjne stosowane w chromatografii gazowej, skoro z literatury tematu wiadomo, że w przypadku tej techniki efekt matrycy wynika z samego procesu chromatograficznego. Autorka sama wskazuje na stronie 41 dysertacji (oraz publikacja 1), że stosowanie selektywnego układu GC/MS redukuje szumy i tło obserwowane przy stosowaniu detektora termojonowego czy też wychwyty elektronów.

Wymaga również wyjaśnienia dlaczego w rozdziale 6 dysertacji zatytułowanym metody analizy statystycznej autorka wskazuje, że stosując analizę składowych głównych w celu lepszego zrozumienia

efektu matrycy poszukiwano korelacji pomiędzy wybranymi właściwościami fizykochemicznymi analizowanych związków przy zastosowaniu różnych metod detekcji w chromatografii gazowej. Recenzent nie kwestionuje w tym miejscu doboru metody statystycznej, która wydaje się właściwa dla złożonego zbioru danych obrazującego właściwości badanych substancji. Niemniej postawione w pracy stwierdzenie wydaje się raczej skrótowo myślowy ponieważ jak zakłada recenzent zamiarem autorki było skorelowanie obserwowanych efektów matrycy z właściwościami fizykochemicznymi a nie analiza korelacji pomiędzy samymi właściwościami.

Niemniej w analizie statystycznej jako zmienne użyto logarytmów współczynników podziału pomiędzy ośrodki lipofilowe i hydrofilowe, prężności par, rozpuszczalności oraz wartość masy cząsteczkowej a także obserwowane efekty matrycy osobno dla GC/MS/MS i detektorów selektywnych. Wymaga wyjaśnienia dlaczego autorka jednocześnie analizuje dane uzyskane różnymi technikami detekcji połączonymi z chromatografią gazową skoro nie to jak wskazano wcześniej decyduje o obserwowanych efektach matrycy. Autorka wskazuje w tym samym rozdziale między innymi, że metoda detekcji miała wpływ na efekty matrycy. Takie stwierdzenie w opinii recenzenta nie jest poparte wystarczającym materiałem dowodowym. Czy nie zostały w tym przypadku uwzględnione efekty związane z obecnością interferencji chromatograficznych nie definiowanych przecież jako „efekt matrycy” sensu stricte ? W opinii recenzenta w celu analizy samego efektu matrycy należało skupić się wyłącznie na wykorzystaniu możliwie selektywnego układu detekcyjnego, który ogranicza możliwie jak najbardziej interferencje chromatograficzne i jak wskazano wcześniej, autorka sama ten fakt podkreśla. Dodatkowo, należy zwrócić uwagę, iż doświadczenia wykonywano na kolumnach chromatograficznych o różnych wymiarach w szczególności średnicy, która decyduje o ilości i masie fazy stacjonarnej. Nasuwa to pytanie w jaki sposób autora wykluczyła różnice w efektach matrycy wynikające z różnic w układach chromatograficznych ? Zwraca m.in. wyraźnie uwagę widoczny na rysunku 5 publikacji 1 kształt i szerokość pików chromatograficznych.

Relatywnie słabym elementem recenzowanej pracy jest układ doświadczeń dotyczących oczyszczania próbek wskazanych w podrozdziałach 3.6.1 – 3.6.5. Autorka nie wyjaśnia na jakiej podstawie dobrany został skład nośników do dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej. Wnikliwy obserwator po zapoznaniu się z układem doświadczeń nabiera wrażenia, że dobór nośników ma raczej charakter przypadkowy. Dla przykładu podrozdział 3.6.2 strona 29, oczyszczanie próbek o niskiej zawartości wody, wariant i) 200 mg Z-SEP+, ii) 12 mg Z-SEP/ 300 mg C18, iii) 60 mg Z-SEP / 50 mg PSA / 10 mg ENVI-Carb / 150 mg PSA. W jaki sposób w tak określonym układzie doświadczeń zbadano wpływ np. nośnika Z-SEP+ i wielkość jego dodatku na uzyskiwane efekty, skoro badano jego wpływ za każdym razem w obecności innych dodatków ? Nie jest również zrozumiałe jak istotna jest różnica pomiędzy nośnikiem określonym jako GCB – tzw. węgiel grafityzowany oraz ENVI-Carb, który również jest węglem grafityzowanym. Podobne wątpliwości budzą dalsze podrozdziały opisujące metody badawcze.

W pracy pojawiły się liczne drobne nieścisłości, przykładowo :

- strona 37 „analitów o budowie planarnej, które ulegają rozkładowi na powierzchni sorbentów”, co jest nie popartą dowodami hipotezą, gdyż najprawdopodobniej anality ulegają po prostu bardzo silnej adsorpcji a nie degradacji;
- strona 37 Tabela 2 nie zawiera danych dotyczących właściwości badanych substancji jak wskazano w tekście;
- strona 38 „w celu ochrony wrażliwych na zmiany temperatury związków”, prawdopodobnie w rozumieniu wrażliwych na procesy hydrolityczne związków, których rozkład szybciej zachodzi w podwyższonej temperaturze;
- strona 41 nie jest jasne na jakiej podstawie uznano np. tolilofluanid za związek o budowie płaskiej;
- strona 43 prawdopodobnie uzyskiwane odzyski nie były słabe a wykazywały niskie wartości;
- strona 45 i 47 z tekstu nie wynika dlaczego w taki a nie inny sposób dobrano skład nośników do oczyszczania, dlaczego zmieniano skład mieszaniny wszystkich dodatków a nie podjęto próby identyfikacji składników o największym lub jedynym znaczeniu w odniesieniu do składników matrycy ?
- strona 47 nie jest jasne w jaki sposób autorzy uzasadniają powiązanie czasu retencji analitów z czasem retencji substancji ochronnych, skoro efekty matrycy nie wynikają w chromatografii gazowej z działania układu detekcyjnego a ze sposobu dozowania próbki ?
- strona 50 zwyczajowo stosowane jest określenie nanosić na kolumnę lub dozować do układu zamiast wprowadzać do kolumny;
- strona 50 produkty powinny zostać określone jako specyficzne i unikatowe raczej niż specyficzne i unikalne;

Powyzsze niedociągnięcia nie rzutują istotnie na całokształt pracy.

Rozdział 9 zatytułowany wnioski budzi u recenzenta znaczny niedosyt, gdyż w obrębie 11 zaprezentowanych punktów w zasadzie tylko 3 pierwsze spełniają kryteria wniosków, pozostałe są raczej stwierdzeniami i uogólnieniami wyników.

Na zakończenie chcę podkreślić, że w oparciu o przeprowadzone prace badawcze Autorka wykazała, że wdrażane przez nią strategie istotnie wpływają na obserwowane efekty matrycy w analizie pozostałości środków ochrony roślin, oraz że efekty matrycy są skorelowane z właściwościami analitów, udowadniając tym samym postawioną na wstępie hipotezę badawczą.

## Ocena końcowa

Na podstawie wnikliwej analizy przedłożonej rozprawy doktorskiej, uważam, że oceniana praca dokumentuje szeroką wiedzę Doktorantki, znakomite opanowanie warsztatu analitycznego i naukowego. Istotnym i pozytywnym elementem pracy jest dokonane połączenie elementu badań podstawowych i aplikacyjnych o dużym znaczeniu dla funkcjonowania laboratoriów badawczych. Na podkreślenie zasługuje również ilość opublikowanych artykułów w czasopismach o istotnych wskaźnikach prestiżu. Praca posiada istotną wartość naukową i wpływa na obecny stan wiedzy i techniki w dziedzinie. Występujące w pracy nieścisłości nie umniejszają bardzo istotnie jej końcowemu naukowemu charakterowi i liczę na ich wyjaśnienie w trakcie publicznej obrony pracy.

W świetle przedstawionej pozytywnej oceny recenzowanej pracy doktorskiej, stwierdzam, że praca zarówno pod względem wartości merytorycznej uzyskanych wyników, jak i ich sposobu prezentacji spełnia wymogi określone w ustawie z dnia 14 marca 2003 r, „o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki” (Dz.U. 2003 nr 65 poz. 595 wraz z późniejszymi zmianami; Dz.U. 2017 poz. 1789), stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Ewy Rutkowskiej do dalszych etapów ubiegania się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Z uprzejmymi pozdrowieniami  
Rozalia An

