

Szczecin, 10.06.2021 r.

dr hab. inż. Małgorzata Gałczyńska, prof. ZUT
Pracownia Chemii Ogólnej i Analizy Środowiska, Katedra Bioinżynierii
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
e-mail: malgorzata.galczynska@zut.edu.pl

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Ewy Rutkowskiej
pt. "Efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości
środków ochrony roślin"

wykonanej w Instytucie Ochrony Roślin - Państwowym Instytucie Badawczym
w Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku

Promotor pracy: prof. dr hab. inż. Bożena Łozowicka

Promotor pomocniczy: dr hab. Piotr Kaczyński, prof. IOR-PIB

Podstawę formalną wykonania recenzji stanowi pismo Sekretarza Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego, dr Katarzyny Nijak z dnia 21 kwietnia 2021 roku (RN/9/610/21), powołujące się na uchwałę Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin- PIB, z dnia 23.03.2021 roku.

1. Informacje wstępne

Podstawę przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej stanowią interdyscyplinarne badania zrealizowane w latach 2016-2019 w Terenowej Stacji Doświadczalnej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego w Białymstoku. Recenzowana praca dotyczy kompleksowej oceny wpływu różnych strategii na efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin techniką chromatografii gazowej w zróżnicowanym materiale roślinnym oraz środowiskowym w modelowych próbkach o niskiej zawartości wody oraz wysokiej zawartości pigmentów (suszone zioła), węglowodanów (suszone owoce), lipidów (nasiona roślin oleistych/warzyw) oraz substancji humusowych (gleby).

2. Charakterystyka rozprawy doktorskiej

Przedłożona rozprawa napisana jest w układzie klasycznym i składa się z 10 rozdziałów wraz załącznikami. Stanowi ona syntetyczne omówienie zbioru czterech powiązanych tematycznie artykułów naukowych o całkowitym współczynniku oddziaływania IF=15.568

i 360 punktach wg MNiSW. Zbiór ten poprzedzono spisem treści, tabel i rycin, wykazem jednotematycznych prac oryginalnych będących przedmiotem rozprawy doktorskiej, streszczeniem w języku polskim i angielskim. Rozdziały 1-2 zawierają opis podstaw teoretycznych, uzasadnienie podjętej tematyki badań, wspólne cele cyklu artykułów, zakres pracy oraz hipotezę badawczą. Rozdziały 3 i 4 są najbardziej rozbudowane i stanowią główną część rozwinięcia tematu badań. W rozdziale 3 przedstawiono charakterystykę badanych obiektów i substancji aktywnych środków ochrony roślin oraz modyfikację metod badawczych, ich walidację i zastosowanych metod analizy statystycznej. W rozdziale 4 omówiono wyniki i przeprowadzono ich dyskusję. W kolejnych rozdziałach od 5 do 9 opisano walidację zoptymalizowanych metod, wyniki przeprowadzonych analiz statystycznych, wdrożenie zoptymalizowanych metod do rutynowych analiz jednoczesnego oznaczania szerokiego spektrum pozostałości środków ochrony roślin w próbkach gleb, ziół i nasion, przedstawiono podsumowanie i wnioski. W rozdziale 10 zamieszczono spis 181 pozycji bibliograficznych. Załączniki stanowiły cztery artykuły naukowe ocenione już przez niezależnych ekspertów z danej dziedziny, zaakceptowane do druku i opublikowane różnych czasopismach z listy A MNiSW w latach 2017, 2018, 2019 i 2020:

1. Łozowicka, B., **Rutkowska, E.**, Jankowska, M. Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD. *Environ Sci Pollut Res*, 2017, 24, 7121–7138. DOI: 10.1007/s11356-016-8334-1.

2. **Rutkowska, E.**, Łozowicka, B., Kaczyński, P. Modification of multi-residue QuEChERS protocol to minimize matrix effect and improve recoveries for determination pesticide residues in dried herbs followed by GC-MS/MS. *Food Anal. Methods* 2018, 11, 709–724. [Doi.org/10.1007/s12161-017-1047-3](https://doi.org/10.1007/s12161-017-1047-3).

3. **Rutkowska, E.**, Łozowicka, B., Kaczyński, P. Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2019, 279, 20–29. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.11.130.

4. **Rutkowska, E.**, Łozowicka, B., Kaczyński, P. Compensation of matrix effects in seed matrices followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues. *J. Chromatogr. A* 2020, 1614, 460738. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460738>.

Dla każdego z powyższych artykułów określono wkład współautorów w publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej. Udział Pani mgr Ewy Rutkowskiej w każdej pracy był bardzo duży, t.j. 80% i polegał na opracowaniu koncepcji pracy i sformułowaniu problemu

badawczego, zgromadzeniu materiału do badań, wyborze obiektu badań i metody badań, opracowaniu własnej metodyki badawczej z włączeniem walidacji, wykonaniu badań eksperymentalnych, analizie i opracowaniu wyników oraz dyskusji, przeglądzie literatury, przygotowaniu manuskryptu w języku angielskim, włącznie z pracami redaktorskimi.

3. Opis uzyskanych wyników

Wyniki przedstawione w rozprawie doktorskiej dotyczą kompleksowej oceny wpływu implementacji różnych strategii na efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości substancji aktywnych środków ochrony roślin z wykorzystaniem chromatografii gazowej w modelowych próbkach roślin oraz środowiskowych o zróżnicowanej zawartości wody, węglowodanów, pigmentów, lipidów oraz substancji humusowych.

W pierwszej części badań dokonano optymalizacji parametrów na etapie przygotowania próbki do badań. Optymalizowano dobór masy próbki spośród trzech naważek: 1; 2; 5 g (publikacja 2), objętość wody spośród trzech wielkości: 5, 7,5; 10 ml i jej temperaturę (publikacja 1 i 4) oraz dokonano wyboru odpowiedniego rozpuszczalnika ekstrakcyjnego jakim okazał się acetonitryl (publikacja 2). Wskaźnikiem oceny był odzysk. Następnie w celu eliminacji odpowiednich substancji interferujących (publikacja 1, 2 i 4) testowano zastosowanie odpowiedniego sorbentu lub ich mieszaniny. Wartość odzysku i efekt matrycy stanowiły podstawę oceny podjętych wyborów. Prowadzono też badania z pominięciem oczyszczania (publikacja 1). Ponadto do oceny efektu matrycy wykorzystano w analizach chromatografię gazową połączoną z selektywnymi detektorami (GC- μ ECD/NPD) oraz tandemową spektrometrią mas i wykazano, że mniej istotny efekt matrycy uzyskano przy zastosowaniu ostatniej z wymienionych technik (publikacja 1). Określono również całkowitą efektywność procesu ekstrakcji i oczyszczania próbki, która dla 64 % analizowanych związków osiągnęła wartość od 80 do 120 % (publikacja 1).

Kolejne badania miały na celu redukcję współekstrahujących składników matrycy poprzez zastosowanie mieszanin konwencjonalnych sorbentów PSA/GCB/MgSO₄ oraz nowych alternatywnych faz dyspersyjnych na bazie Z-Sep, ENVI-Carb i ChloroFiltr (publikacja 2). Najlepsze efekty redukcji uzyskano dla mieszaniny sorbentów PSA/ENVI-Carb/MgSO₄ w badaniach chabra bławatka, rumianku i tymianku przy jednoczesnym zachowaniu wysokich wartości odzysku dla około 68 % analizowanych substancji (60-128 %). Ustalono również, że w matrycy suszonych ziół kluczowymi parametrami wpływającymi na efekt matrycy są budowa chemiczna i polarność analitów (publikacja 2).

Następne badania związane były z oceną wpływu użycia pojedynczych sorbentów oraz kombinacji sorbentów w różnych proporcjach masowych PSA/C18/GCB/MgSO₄ na usunięcie

substancji interferujących w matrycy nasion (publikacja 4). W pierwszym przypadku uzyskano niezadawalające efekty usunięcia składników matrycy, a w drugim dla proporcji składników równej 50/150/50/50 mg, odpowiednio, ponad 85% analizowanych związków charakteryzowała się nieistotnym efektem matrycy przy jednoczesnym zachowaniu wysokich wartości odzysku (61-128 %). Zaobserwowano także, że ze zmniejszającym się stężeniem analitów następuje wzrost efektu matrycy. Wzmocnienie sygnału chromatograficznego wystąpiło dla 93 % analizowanych związków a jego tłumienie sporadycznie. Związki polarne, czy też o dużych masach cząsteczkowych oraz zależne od pH bądź posiadające w swojej budowie grupy chemiczne wykazujące powinowactwo do miejsc aktywnych w układzie GC wykazują istotne efekty matrycy (publikacja 4).

W drugiej części badań skupiono się na blokowaniu miejsc aktywnych w układzie GC (publikacja 3). Testowano następujące strategie: metodę krzywej kalibracyjnej sporządzonej w ekstrakcie matrycy (nr 1); dodatek mieszaniny substancji ochronnych do analizowanych ekstraktów i wzorców (nr 2) oraz wprowadzenie mieszaniny substancji ochronnych do kolumny przed analizą ekstraktów z próbek (nr 3). W analizach wykorzystano próbki suszonych ziół i owoców. Niski efekt matrycy uzyskano przy zastosowaniu strategii krzywej kalibracyjnej dla zróżnicowanej liczby analizowanych związków (27-74 %) w zależności od badanej rośliny czy owoców. W wyniku zastosowania kolejnych strategii (nr 2) otrzymane dane nie różniły się istotnie. Ponad 75 % analizowanych substancji nie wykazało istotnych efektów matrycy we wszystkich badanych roślinach i owocach. Podczas wykonywania analiz rutynowych strategia nr 3 okazała się bardziej ekonomiczna, praktyczna, łatwiejsza a zarazem szybsza w porównaniu ze strategią nr 2. Dodatkowo strategia nr 3 nie wyeliminowała całkowicie efektu matrycy dla wszystkich testowanych analitów. Decydowała o tym polarność analitów jak i ich masa cząsteczkowa. Średnie tłumienie lub wzmocnienie sygnału chromatograficznego zaobserwowano dla niektórych związków karbaminianowych. Z kolei związki zawierające grupę $-NH-CO-NH-$ oraz grupę $-N=$, dały średni/wysoki efekt matrycy (publikacja 3). Zastosowanie kwasu szikimowego znacząco wpłynęło na otrzymane wyniki analitów zależnych od pH. Efekt matrycy w dużym stopniu został zredukowany (publikacja 3).

Poprawę stabilności systemu GC-MS/MS uzyskano poprzez wprowadzenie mieszaniny substancji ochronnych do kolumny przed analizą ekstraktów z próbek, co zmniejsza potrzebę częstszej konserwacji aparatury (publikacja 3).

W publikacji 4 przeprowadzone pionierskie badania potwierdziły podobieństwo efektu matrycy badanych analitów we wszystkich testowanych gatunkach nasion poprzez przygotowanie krzywych kalibracyjnych i dokonanie oceny wyników końcowych, które nie

wykazały istotnych statystycznie różnic. W związku z tym rekomenduje się wykorzystanie matrycy reprezentatywnej, co zmniejsza liczbę wykonywanych analiz.

4. Ocena rozprawy doktorskiej

Tematyka podjęta w rozprawie doktorskiej jest aktualna oraz ma znaczenie teoretyczne i praktyczne. We współczesnym rolnictwie osiągnięcie dużych plonów płodów rolnych o wysokiej jakości jest bardzo trudne do uzyskania bez stosowania chemicznej ochrony roślin. Substancje aktywne zawarte w preparatach chemicznych wykorzystywanych do ochrony roślin charakteryzują się zazwyczaj toksycznym charakterem, dużą trwałością, zdolnością do bioakumulacji czy mobilnością w środowisku. Wzrastające zużycie pestycydów już od połowy XX wieku wpłynęło negatywnie na środowisko i stworzyło ryzyko dla zdrowia ludzkiego. Analiza jakości produktów rolnych ma coraz większe znaczenie nie tylko ze względu na wymogi, jakie muszą spełniać te produkty w Unii Europejskiej oraz dużą konkurencyjność na międzynarodowym rynku, ale także w związku z rosnącą świadomością konsumentów dbających o właściwe żywienie dla zachowania zdrowia. Nieodzownym staje się zatem opracowanie nowych i coraz dokładniejszych metod kontroli jakości, do których należy m.in. oznaczenie w nich pozostałości środków ochrony roślin. Analiza obecności i określenie bardzo małego stężenia ($< 0,005 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) wielu substancji aktywnych w próbkach roślinnych czy glebowych nie jest prostym procesem z uwagi na współwystępowanie substancji interferujących, które wpływają na błędną interpretację wyniku. Dodatkowo wprowadzanie do praktyk rolniczych nowych pestycydów wymusza na analitykach modyfikację i rozwijanie opracowanych wcześniej metod wielopozostałościowych, które będą charakteryzowały się akceptowalnymi odzyskami, dobrą precyzją, wysoką czułością, niskim kosztem, a także szybkością, łatwością i bezpieczeństwem wykonania. Do najważniejszych osiągnięć naukowych i aplikacyjnych ocenianej dysertacji zaliczyłabym opracowanie przez mgr Ewę Rutkowską dwóch nowatorskich strategii prowadzących do częściowej lub całkowitej redukcji efektu matrycy w modyfikowanej wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin techniką chromatografii gazowej w modelowych próbkach o niskiej zawartości wody oraz wysokiej zawartości pigmentów, węglowodanów, lipidów oraz substancji humusowych. Dodatkowo Doktorantka wskazała na powiązanie właściwości fizykochemicznych badanych analitów oraz metod detekcji z efektem matrycy. Przedstawione w rozprawie doktorskiej rozwiązania analityczne zostały ocenione za pomocą parametrów walidacyjnych (akceptowalny odzysk, współczynnik korelacji, niepewność, miękki efekt matrycy). Zoptymalizowane metody wdrożono do rutynowych analiz jednoczesnego oznaczania szerokiego spektrum pozostałości środków ochrony roślin w próbkach gleby, ziół

i nasion. Wytypowano również matrycę reprezentatywną dla produktów o wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej wody do sporządzenia krzywych kalibracyjnych, skracając czas i upraszczając wykonanie analiz. Uzyskane wyniki badań poprzez swój nowatorski charakter poszerzyły dotychczasową wiedzę związaną z wpływem zastosowania różnych strategii na efekt matrycy w analizie pozostałości środków ochrony roślin w produktach rolnych i środowiskowych.

5. Pytania do Doktorantki

1. Jakie widzi Pani nowe możliwości skrócenia czasu wykonywania analiz pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych przy zachowaniu ich udokumentowanej wiarygodności?

2. Jaki jest skład środków ochrony roślin poza obecnością w nich substancji aktywnych? Jak te substancje wpływają na przebieg analiz chemicznych i ich wyniki? Proszę o odpowiedź na wybranym przykładzie.

3. Czy istnieją szanse, by w przyszłości ograniczyć chemiczną ochronę roślin w produkcji płodów rolnych? Proszę o odpowiedź na wybranym przykładzie.

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Przedstawiona powyżej charakterystyka rozprawy doktorskiej upoważnia mnie do bardzo wysokiej oceny, zarówno wybranej tematyki, jak i sposobu zrealizowania postawionego zadania. Praca doktorska jest spójna merytorycznie i została napisana zwięzłym językiem. Zamieszczone w opracowaniu tabele i rysunki w sposób logiczny i jasny syntetyzują warunki przeprowadzenia obszernych badań, co dzięki również estetycznej formie sprawia, że pracę czyta się ze zrozumieniem, mimo tego, że dotyczy ona szerokiej wiedzy z zakresu rolnictwa, chemii i statystyki.

Doktorantka udowodniła, że potrafi samodzielnie sformułować i rozwiązać problem naukowy, dobrze dobrać i opanować techniki badawcze, a także przeprowadzić dyskusję swoich wyników zweryfikowanych prawidłowo poprzez analizę statystyczną z wynikami innych zespołów badawczych. Doktorantka udowodniła również, że posiada zdolności do prowadzenia samodzielnych badań, a także umiejętności współdziałania w większej grupie przy realizacji bardziej ambitnych programów naukowych. Rozszerzenie zastosowanych strategii o nowe matryce, jak i analizowane związki oraz opracowanie nowych strategii stanowią wyzwania do dalszej pracy badawczej.

Rozprawa wnosi istotne elementy poznawcze o charakterze nowatorskim do poszerzenia stanu wiedzy na temat wpływu implementacji różnych strategii na efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin techniką chromatografii gazowej w zróżnicowanym materiale roślinnym oraz środowiskowym.

Kilka drobnych uchybień o charakterze edytorskim, których tutaj nawet nie przytaczam, nie może wpłynąć na bardzo wysoką ocenę rezultatów przedstawionych w rozprawie doktorskiej Pani mgr Ewy Rutkowskiej.

Stwierdzam, że oceniana rozprawa doktorska mgr Ewy Rutkowskiej pt. „*Efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin*” spełnia wymogi określone w art. 13 ustawy 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, z póź. zm.). Wnoszę zatem do Wysokiej Rady Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego o dopuszczenie mgr Ewy Rutkowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na ważność tematyki badawczej, publikację wyników badań w uznanych czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym, ich widoczny wkład dla reprezentowanej przez siebie dziedziny nauki (sumaryczna liczba cytowań czterech artykułów naukowych wg Web of Science – 100) oraz stopień indywidualnego zaangażowania Doktorantki w powstanie prac zbiorowych, a także wzorcowe opracowanie samej dysertacji uznaję rozprawę doktorską jako wyróżniającą się. W związku z tym wnoszę do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Ochrony Roślin - Państwowego Instytutu Badawczego wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Ewy Rutkowskiej pt. *"Efekt matrycy w wielopozostałościowej metodzie oznaczania pozostałości środków ochrony roślin"*.


dr hab. inż. Małgorzata Gałczyńska, prof. ZUT