

O C E N A

rozprawy doktorskiej mgr inż. Anny Przybylskiej pt. „Chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu (*Crataegus* spp.) stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety” wykonanej pod kierunkiem prof. dra hab. n. farm. inż. Grzegorza Bazylaka, Prof. UMK. Przedłożona rozprawa doktorska została wykonana w Katedrze i Zakładzie Bromatologii Wydziału Farmaceutycznego Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu i została przedstawiona Radzie Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Podstawą przygotowania recenzji jest pismo Pani dr hab. inż. Agnieszki Tórz, prof. ZUT, Dziekana Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Ocena układu redakcyjnego rozprawy

Oceniana rozprawa przedstawiona jest w zwartym maszynopisie liczącym 100 stron komentarza oraz pięciu oryginalnych artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej. Całość rozprawy poprzedzona jest przydatnym wykazem skrótów stosowanych w pracy oraz streszczeniem, edytowanym w języku polskim i angielskim. Wstęp rozprawy (rozdział I), liczący 38 stron tekstu, stanowi przegląd literatury prezentujący wielokierunkowo charakterystykę problemu. Rozdział II prezentuje główny cel badań, hipotezy oraz cele uzupełniające wraz z uzasadnieniem badań; rozdział ten zajmuje jedną stronę tekstu. Rozdział III zatytułowany **Materiał badawczy** obejmuje 2 strony tekstu; w rozdziale tym Doktorantka w sposób bardzo krótki i zwięzły opisała analizowane produkty oraz zaprezentowała schemat analiz wykonanych w ramach badań objętych przedłożoną rozprawą. Ponadto Doktorantka zaznaczyła, iż pełną charakterystykę, bardziej szczegółowy skład badanych produktów, procedurę wykonania wodnych naparów oraz pełniejszy opis schematu analiz w ramach prac objętych rozprawą doktorską można znaleźć w trzech publikacjach, które są podstawą przedłożonej rozprawy doktorskiej. Rozdział IV zatytułowany „**Wyniki**” obejmuje 36 stron tekstu; rozdział ten zawiera zwięzły opis zoptymalizowanych metod SPE-HPTLC używanych do oznaczania patuliny z roztworów modelowych oraz soków owocowych; rozdział ten prezentuje również najważniejsze uzyskane wyniki. Rozdział IV stanowi najobszerniejszą część komentarza.

Rozdział V zatytułowany „**Dyskusja**” obejmuje 9 stron tekstu; w rozdziale tym Doktorantka w sposób zwięzły przedstawiła najważniejsze elementy analizy uzyskanych rezultatów. Natomiast 3 strony tekstu stanowi rozdział VI zatytułowany „**Podsumowanie i wnioski**”; w rozdziale tym Doktorantka zamieściła zwięzłe podsumowanie oraz sformułowała 9 finalnych wniosków.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że na szczególne wyróżnienie zasługuje podane przez Doktorantkę najważniejsze oraz unikalne osiągnięcie przedłożonej dysertacji doktorskiej (strona 85).

Rozdziały I, III, IV oraz V podzielone są na podrozdziały.

W kolejnym rozdziale zatytułowanym „**Piśmiennictwo**” Doktorantka zamieściła pełne dane bibliograficzne (rozdział VII); to obszerne piśmiennictwo obejmuje aż 13 stron tekstu. Na szczególne uznanie zasługuje fakt, iż przeważająca część tych prac stanowią źródła obcojęzyczne. Ponadto

przeważająca część tych prac ukazała się w ciągu ostatnich 15 lat, przy czym zostały one opublikowane w czasopiśmie z listy Journal Citation Reports.

Do niniejszego bardzo obszernego **komentarza (liczącego 100 stron tekstu)** Doktorantka dołączyła kopie **pięciu oryginalnych artykułów** będących podstawą przedłożonej rozprawy doktorskiej wraz z **oświadczeniami** o procentowym udziale współautorów tych publikacji (od str. 101 do str. 122).

Doktorantka zamieściła również swój **życiorys naukowy** (dwie strony tekstu; strona 123 i 124) wraz z **załącznikiem 1** (cztery strony tekstu). **Załącznik** ten zawiera bogaty wykaz oryginalnych publikacji naukowych oraz długą listę komunikatów krajowych i zagranicznych; Doktorantka jest współautorką niniejszych publikacji oraz przedłożonych komunikatów. **W opinii recenzenta, niezbyt fortunne jest nie deklarowanie tego ważnego dla Doktorantki załącznika 1 w spisie treści komentarza.** Załącznik ten poprzedza **rozdział X** (od str. 129 do str. 200) zatytułowany **Publikacje oryginalne autora rozprawy** (tj. oryginalne artykuły Doktorantki, które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej).

Z przyjemnością stwierdzam, iż układ przedłożonej rozprawy doktorskiej jest typowy dla opracowania o charakterze doświadczalnym, zachowane są właściwe proporcje pomiędzy częścią teoretyczną oraz eksperymentalną. Komentarz do publikacji stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej został zredagowany w sposób prawidłowy, z użyciem odpowiedniej terminologii naukowej. Na podkreślenie zasługuje przejrzystość prezentacji eksperymentu badawczego, zastosowanych technik analitycznych i rezultatów badań oraz bardzo staranne przygotowanie pracy pod względem edytorskim. Słowa uznania należą za należyte zredagowane tabele oraz rysunki, które przy tak obszernym zakresie eksperymentalnym były wręcz koniecznością.

Z pełnym uznaniem stwierdzam, iż Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z redakcją poszczególnych rozdziałów komentarza. Treść i ich forma nie przeszkadzają sobie, a wprost przeciwnie, wzajemnie się uzupełniają. W opinii recenzenta, pod względem redakcyjnym, a w szerszym tego słowa znaczeniu – także edycyjnym, przedłożona rozprawa doktorska może być wzorem, właściwego opisywania tego typu rezultatów badań.

Z pełnym przekonaniem odnotowałem, iż podstawę dysertacji doktorskiej stanowi cykl pięciu bardzo trafnie dobranych monotematycznych prac twórczych [P-1 – P-5] opublikowanych w latach 2011 – 2019. Z przyjemnością stwierdzam, iż Doktorantka miała imponujący wkład w powstaniu każdej z tych pięciu oryginalnych artykułów stanowiących podstawę przedłożonej rozprawy. Wkład Doktorantki w powstawaniu niniejszych prac wynosił odpowiednio: 40%, 80%, 80%, 80% oraz 40%.

Uzasadnienie podjęcia tematu badawczego oraz ocena użytych technik analitycznych

W Polsce oraz innych krajach Unii Europejskiej wzrasta wśród różnych grup ludzi zainteresowanie suplementami diety oraz żywnością funkcjonalną, jako jeden ze sposobów terapii i samouzdrawiających możliwości organizmu ludzkiego; ten silny trend prozdrowotny przyczynił się do wydłużenia średniej długości życia ludzi o ponad 7 lat w porównaniu do początku lat 90. Ciągły i intensywny marketing oraz powszechna dostępność suplementów diety sprawia, iż coraz większa grupa osób systematycznie spożywa te suplementy w artykułach spożywczych. Jednakże przeprowadzona kontrola NIK wykazała, iż w Polsce nie jest zapewniony zadowalający poziom bezpieczeństwa suplementów diety. Eksport i import suplementów diety (np.: herbatek owocowych i ziołowych, syropów, surowców zielarskich lub skoncentrowanych soków owocowych) powoduje, że rośnie niebezpieczeństwo migracji zanieczyszczeń, związków antyodżywczych i mikotoksyn w artykułach spożywczych; wzrasta również możliwość zainfekowania grzybami pasożytniczymi suplementów diety oraz żywności funkcjonalnej. Szczególnie ważne, aby owoce i zioła używane do produkcji suplementów i mieszanek ziołowych były zdrowe i niezainfekowane grzybami; zmniejsza to ryzyko zagrożenia zdrowia związanego ze spożyciem tych artykułów spożywczych. Niestety postępująca liberalizacja oraz

wzrost międzynarodowej wymiany handlowej sprawia, iż pojawia się potrzeba ciągłej kontroli surowców zielarskich (w tym suszonych owoców, szczególnie głogu), syropów lub soków owocowych. (Aż 98% próbek skoncentrowanego soku jabłkowego eksportowanego z Chin w latach 2006-2010 było zainfekowanego patuliną.) Niezadawalająca jest w Polsce liczba kontroli oceniających rozmiar skażenia mikrobiologicznego suplementów diety, surowców zielarskich oraz mieszanek ziołowych. Niestety zanieczyszczenie mikrobiologiczne jest integralną częścią ekosystemu w trakcie uprawy np.: majeranku, rumianku, bazylii lub tymianku. Poziom grzybów pleśniowych w produktach żywnościowych zależy od temperatury, wilgotności i odczynu środowiska oraz od sposobu zbierania surowców roślinnych, suszenia i przechowywania. Mikotoksyny, będące wtórnym metabolitem grzybów pleśniowych, są poważnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi. Wyżej wymienione surowce zielarskie, w tym również lecznicze surowce zielarskie, mogą być zainfekowane są mikotoksynami, m.in. patuliną. Patulina jest metabolitem wtórny niektórych pleśni rozwijających się na wielu gatunkach owoców i warzyw. Patulina jest szczególnym zagrożeniem dla zdrowia ludzi; metabolit ten posiada bowiem właściwości mutagenne, teratogenne oraz prawdopodobnie rakotwórcze.

Pomimo licznych doniesień potwierdzających skażenie wielu surowców zielarskich mikotoksynami, w Polsce ciągle mało wiadomo jest o gromadzeniu się **szczególnie patuliny w żywności funkcjonalnej oraz w suplementach diety**. Powszechna dostępność żywności funkcjonalnej i suplementów diety, w tym takich które zawierają surowce roślinne, skłania do postawienia pytania o bezpieczeństwo ich stosowania.

Z świetle powyższych faktów, w pełni zasadne jest opracowanie przez Doktorantkę nowych chromatograficznych metod mikroanalitycznych, przydatnych do wiarygodnego oznaczania śladowych ilości patuliny w żywności funkcjonalnej, suplementach diety i mieszankach ziołowych uzyskiwanych z owoców głogu. Również z pełnym uznaniem stwierdzam, iż wybór owoców głogu jest bardzo celowy oraz uzasadniony. Istotnie, głóg (szczególnie jego owoce) dzięki dużej zawartości fenolokwasów, amin, fitosteroli, witaminy C, witamin z grupy B, garbników, pektyn i soli mineralnych jest najbardziej cenioną rośliną leczniczą. Doktorantka opracowała również metody oznaczania patuliny w soku jabłkowym; wybór tego soku także uważam za bardzo trafny; ten bardzo popularny sok zaliczany jest bowiem do artykułów spożywczych o bardzo wysokiej wartości odżywczej.

Z przyjemnością stwierdzam, iż do realizacji zaplanowanych zadań badawczych, Doktorantka wykorzystwała niezwykle szeroki zakres technik analitycznych (szczególnie metody ekstrakcji do fazy stałej; SPE), wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC), gradientową ultra-wysokosprawną chromatografię cieczową sprzężoną z tandemowym spektrometrem mas (SPE-UHPLC-MS/MS), skaningową (SEM) i transmisyjną (TEM) mikroskopię elektronową, spektrometrię mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS/MS), metody spektrofotometryczne, miareczkowe, potencjometryczne oraz metody płytkowe (analiza mikrobiologiczna).

W mojej opinii, na szczególne wyróżnienie zasługuje opracowane przez Doktorantkę oryginalne metody SPE, w których do ekstrakcji patuliny zostały wykorzystane dwa rodzaje niemodyfikowanych wielościennych nanorurek węglowych różniących się morfologią oraz parametrami fizykochemicznymi.

Wszystkie metody ekstrakcji oraz metody chromatograficznego oznaczania analitów (szczególnie patuliny) zostały szczegółowo opisane (w komentarzu i/lub w publikacjach stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej) zarówno w kontekście zasady poszczególnych technik analitycznych, jak i parametrów konkretnego zadania badawczego wraz z opisem użytej aparatury badawczej. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie nowoczesnej aparatury (szczególnie SPE-UHPLC-MS/MS oraz ICP-MS/MS), która pozwalała na wykrywanie analitów (m.in. patuliny) na bardzo niskich poziomach detekcji (tj. LOD i LOQ), zadowalającego ich rozdzielania i identyfikacji oraz zadowalającej dokładności, precyzji i powtarzalności.

W związku z powyższym z uznaniem stwierdzam, iż zakres badanych cech jest bardzo szeroki i w pełni uzasadniony, a zastosowane procedury SPE oraz instrumentalne metody analityczne należy uznać za nowoczesne, pozwalające na zrealizowanie założonych celów badawczych. Poza opanowaniem nowoczesnych metod analitycznych Doktorantka wykazała się również dużymi umiejętnościami interpretacji wyników oraz poprawnej dyskusji. Z pełnym przekonaniem mogę wysoko ocenić kompetencje analityczne Doktorantki.

Z obowiązku recenzenta przedstawiam poniżej drobne uwagi dotyczące doboru technik analitycznych oraz badanych składników żywności funkcjonalnej i suplementów diety:

1. W opinii recenzenta niezbyt fortunate jest pominięcie w komentarzu i/lub dołączonych publikacjach możliwości użycia bardzo krótkich C18-kolumn (30 mm x 2,1 mm), zawierające wypełnienie C18 o średniej wielkości ziarna 1,7 μm ; nowoczesne chromatografy cieczone (LC) wyposażone w tak wysokosprawne kolumny oraz detekcję MS/MS pozwoliłyby na osiągnięcie znakomitej rozdzielczości oraz jakościowej i ilościowej detekcji analitów (w tym patuliny); ponadto całkowity czas LC-MS/MS analizy próbki mógłby nie przekroczyć 5 min. Tak krótki czas analizy (obejmujący również przygotowanie do kolejnej LC-MS/MS analizy) znacząco zwiększyłby liczbę kontrolnych analiz oceniających rozmiar skażenia mikrobiologicznego suplementów diety, surowców zielarskich, mieszanek ziołowych. W mojej opinii, użycie systemu LC-MS/MS pozwoliłoby na znaczące uproszczenie procedury przygotowania próbek do oznaczania patuliny. Spektrometria mas (tryb SIM) pozwala bowiem na oznaczanie analitów bez konieczności zadowalającego ich oddzielenia od innych endogennych substancji analizowanej próbki.

2. Analizując tekst pierwszego artykułu [P-1] odnotowałem pewne nieścisłości (str. 63). Prekolumny używane są standardowo do zabezpieczenia kolumny analitycznej (znacznie droższej niż prekolumna). C18-prekolumna połączona z C18-kolumną analityczną standardowo powinna zawierać takie samo wypełnienie. Prekolumna eliminuje z analizowanej próbki czynniki degradujące sprawność kolumny analitycznej (np.: mikro-osady, białka, etc.); o jakości separacji analitu (np. patuliny) od substancji endogennych próbki decyduje sprawność kolumny analitycznej, sposób elucji i/lub detekcji.

3. Poziom endogennych substancji przeszkadzających w chromatograficznym oznaczaniu patuliny zmniejsza np. ekstrakcja SPE. Czy odnotowane, w dysertacji doktorskiej i cytowanych publikacjach, różnice w odzysku patuliny oraz innych analitów z kolumnienek SPE nie wynikały również z użycia eluentów o różnych stopniach czystości (np.: HPLC, HPLC gradientowa, HPLC super-gradientowa, GC lub GC-MS) ? Niekoniecznie rozpuszczalniki o wyższej czystości gwarantują większą wartość odzysku analitu z kolumnienek SPE; ponadto objętość rozpuszczalnika niezbędna do ekstrakcji SPE może być uzależniona od stopnia czystości rozpuszczalnika.

4. Doktorantka badała wydajność selektywnej ekstrakcji patuliny metodą SPE z klarowanych soków jabłkowych. Należy jednak naciskiem stwierdzić, iż naturalnie mętne soki jabłkowe zapobiegają nowotworom i starzeniu się oraz wspomagają ogólną odporność organizmu. Żaden klarowany sok jabłkowy nie posiada takich cennych właściwości. Zatem nasuwają się następujące pytania:

Jakie przesłanki zdecydowały o wyborze jedynie klarowanych soków jabłkowych ?

Jak realizowana byłaby metoda ekstrakcji SPE patuliny soku z owoców głogu, w których naturalnie pojawia się osad (tj. z naturalnie mętnych soków z owoców głogu) ?

Czy naturalnie występujący osad na przykład w soku z owocu głogu może posiadać zdolność absorpcyjną i/lub adsorpcyjną patuliny ?

5. Jakie przesłanki skłoniły Doktorantkę do oznaczania stężenia Mn, Fe, Cu i Zn w suplementach diety oraz mieszanek ziołowych zawierających suszone owoce głogu ? Jest bowiem wiele innych niezbędnych dla człowieka mikroelementów (na przykład takie mikronutrienty jak selen, fluor, jod, chrom, kobalt, bor lub molibden).

6. W mojej opinii tytuł dysertacji doktorskiej nie odzwierciedla w pełni jej treści; brakuje w nim informacji o badanym soku jabłkowym.

PODSUMOWANIE

Z przyjemnością stwierdzam, iż przedłożona do oceny dysertacja jest bardzo interesującym opracowaniem, na który składają się obszerny komentarz oraz pięć oryginalnych artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej. Komentarz zawiera starannie zredagowane teoretyczne podstawy tematu, hipotezy i cele dysertacji, opis nieomal optymalnie zaplanowanych eksperymentów i przeprowadzonych badań w oparciu o innowacyjną metodykę oraz w pełni zadowalającą interpretację uzyskanych wyników badań. Z pełnym przekonaniem można stwierdzić, że uzyskane rezultaty zadań

badawczych posiadają zarówno wartości poznawcze jak i praktyczne oraz mogą być podstawą do dalszych prac w tym zakresie. **Z przyjemnością stwierdzam, iż czwarty [P-4] oraz szczególnie piąty [P-5] oryginalny artykuł charakteryzuje się bardzo wysokim poziomem naukowym oraz prezentuje bardzo ciekawe i cenne rezultaty badań. W mojej opinii piąta oryginalna publikacja [P-5] może być ozdobą rozprawy habilitacyjnej.** W opinii recenzenta, mgr inż. Anna Przybylska zrealizowała założone w rozprawie cele badawcze.

W podsumowaniu pragnę podkreślić, że zawarte w recenzji drobne uwagi oraz wątpliwości nie umniejszają wartości merytorycznej dysertacji doktorskiej. Moim zdaniem przedłożona rozprawa posiada znaczące walory poznawcze oraz aplikacyjne.

Z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż dysertacja doktorska pt. „Chromatograficzne metody ekstrakcji i oznaczania patuliny w owocach głogu (*Crataegus* spp.) stanowiących składniki żywności funkcjonalnej i suplementów diety” spełnia warunki określone w art. 13 ustawy z dnia 14.03.2003 r. (Dz.U. Nr 65, poz. 595, z późn. zm.) o stopniach naukowych oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. poz. 1789).

W związku z powyższym wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego o dopuszczenie mgr inż. Anny Przybylskiej do dalszych etapu przewodu doktorskiego.

Z poważaniem



Prof. dr hab. Marian Czauderna