UNIWERSYTET
PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU

KATEDRA CHEMII ŻYWNOŚCI I BIOKATALIZY

Prof. dr hab. Antoni Szumny Wrocław, 2022-12-14

Recenzja Rozprawy Doktorskiej

Pani mgr inż. Natalii Galant pt.:

„*Wdrożenie metod wykrywania leków i substancji psychoaktywnych w suplementach diety i produktach spożywczych*"

wykonanej w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytetu Przyrodniczego we Poznaniu

promotor prof. dr hab. Agnieszka Piotrowska-Cyplik

Uwagi ogólne na temat przedstawiony w dysertacji

Zapewnienie odpowiedniej jakości produktów spożywczych, w tym suplementów diety jest kluczowym zagadnieniem w obszarze technologii żywności. W kontekście bezpieczeństwa, związanym z obecnością wybranych substancji toksycznych, np. aflatoksyn, trichotecenów, ochratoksyn, zearalenonu, patulin, fuminozydów, WWA, dioksyn czy nawet akrylamidu oznaczenia analityczne zostały już bardzo dobrze rozpoznane i większość z wiodących form z obszaru chromatografii dostarcza gotowe noty aplikacyjne. Są one przetestowane i najczęściej zwalidowane. Sytuacja o obszarze identyfikacji leków (w tym substancji psychoaktywnych) wydaje się być zgoła odmienna. Mnogość poszczególnych cząsteczek aktywnych, różne rodzaje matrycy czy ostatecznie przeszkadzająca obecność wielu metabolitów wtórnych w produktach roślinnych sprawia, że tematyka opracowania procedur identyfikacji jakościowej i ilościowej wydaje się być bardzo zasadna. Doktorantka wyznaczyła sobie bardzo ambitny cel opracowania ekonomicznych metod oznaczania ilościowego możliwie jak największej liczby substancji

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
KATEDRA CHEMII ŻYWNOŚCI I BIOKATALIZY
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
tel. 071 3205-147; 694 647 222
e-mail: antoni.szumny@upwr.edu.pl • www.upwr.edu.pl/kch

leczniczych (oraz kannabinoidów) w pełni go realizując. Należy tu podkreślić iż badania prowadzone były w ramach II edycji konkursu MNiSW „*Doktorant wdrożeniowy*".

Ocena celu pracy i metodologii badań, służących rozwiązania podjętych problemów i wyników

W przedstawionej dysertacji Autorka podjęła się uzupełnienia stanu wiedzy w obszarze identyfikacji jakościowej i ilościowej substancji leczniczych oraz związków z grupy kannabinoidów. Głównymi, bardzo obszernymi w mojej opinii, celami badawczymi postawionymi sobie przez Doktorantkę były:

a) opracowanie metody wykrywania i jednoczesnego oznaczenia ilościowego niemal **500** substancji psychoaktywnych w suplementach diety w postaci proszków;

b) opracowanie metody wykrywania oraz jednoczesnego oznaczenia **13** naturalnych i **117** syntetycznych pochodnych w suplementach diety i produktach spożywczych w postaci olejów.

Stwierdzam, że wszystkie postawione przed sobą cele badawcze zostały przez Doktorantkę całkowicie zrealizowane.

Świadczy to nie tylko o bardzo dobrze zorganizowanym warsztacie badawczym, ale też o wielkim nakładzie pracy eksperymentalnej, którą Autorka wymienionej dysertacji musiała wykonać. Przy tak licznej grupie badawczej oraz wykonanych powtórzeniach, szacowana przeze mnie ilość tylko analiz chromatograficznych (LC-MS) prezentowanych w dysertacji wynosi kilkaset, a więc czas włożony w ich wykonanie i interpretacje musiał być naprawdę olbrzymi.

Metodyka analityczna stosowana w trakcie realizacji pracy doktorskiej była standardowa dla tego typu badań. Pani Natalia Galant posłużyła się techniką tandemowej spektrometrii mas (LC-MS/MS). Do identyfikacji ilościowej Doktorantka posłużyła się standardami o czystości powyżej 98% zakupionymi komercyjnie. Rozcieńczenia wykonywano w metanolu. Tutaj mam potencjalną wątpliwość, czy wszystkie wzorce, nawet w tak niewielkim początkowym

rozcieńczeniu, tj. 1 mg/mL były dobrze rozpuszczalne? Roztwory kannabinoidowe z kolei sporządzono otrzymując roztwór wyjściowy 0.5 µg/mL. Autorka nie opisała tutaj, jakie stężenia początkowe zostały zastosowane. Do wykonania oznaczenia, w trakcie realizacji badań wykonywano wszystkie niezbędne czynności, tj. dobór warunków chromatografii, sporządzenie krzywych kalibracyjnych, opracowano metody izolowania analitów z matrycy, walidowano procedurę finalnie weryfikując opracowaną metodę analityczną. Jako oznaczane związki wytypowano 502 substancje psychoaktywne z 10 grup chemicznych, szczegółowo wymienionych na stronie 55 dysertacji. Walidację metody określono zgodnie z rekomendacjami SWG TOX, 2013 oceniając odpowiednio: selektywnośc, granicę wykrywalności, granicę oznaczalnosci, dokładność, obciążenie, precyzję, niepewność pomiaru, integralność rozcieńczeń przeniesienie i, co istotne a bardzo często pomijane w tego typu pracach, efekt matrycy. Warunki pomiarów wyznaczano poprzez określenie rodzaju polaryzacji, jon prekursorowi Q1, jon potomny Q3, potencjał deklasteringu DP, potencjał wejścia EP, energię kolizji CE i potencjał wyjścia komory zderzeń. Parametry analizy Autorka szczegółowo przedstawiła w Tabeli 462-99. Zdaję sobie doskonale sprawę z obszerności Tabeli, jednak w moim przekonaniu dopełniającą tu informacją mogło by być umieszczenie wzoru sumarycznego i masy molowej analitu, pozwalając zaoszczędzić Tabeli S4. Nie jest też dla mnie do końca jasne, czym jest przedstawiona kontrola wewnętrzna. Za największy sukces Doktorantki uważam tu przedstawienie (Ryc. 24) tzw. *mastemix multimetody*. Tak dobrze dobranej metody w kontekście zarówno rozdziału jak i bardzo rozsądnego czasu, mogły by pozazdrościć wiodące firmy rynku analitycznego. Analogiczną uwagę mogę tu dać dla chromatogramu „*mastermix kannabinoidy*". Przedstawiona na stronie 125 granica wykrywalności była na poziomie 0,05 ng/mL, podczas gdy deklarowana granica oznaczalnmości 0,5 ng/mL. Do badań produktów konopnych wytypowano 10 produktów, tj. olej z nasion zawiarających ekstrakt jak również kapsułki. W przedstawionej Tabeli 13, str. 132 zastanawia brak (lub obecność poniżej 0,01%) THCA, CBDA dla niektórych wariantów. Doświadczenia (posługującego się jednak najczęściej technikami GC-MS piszącego te słowa) są odmienne. Jednak rozumiem, że specyfika materiału biologicznego może to powodować. Zastanawia również brak jakichkolwiek śladów kannabinoidów dla próbki nr 10, Tabela 13. Jest to dosyć zaskakujący rezultat. W tymi miejscu zastanowił bym się, czy zamiast informacji, że

substancji jest mniej niż 0,01% nie wygodniej było by opisać, że nie została wykryta przy przedstawionych progach oznaczalności. Rodzi się też tu pytanie, dlaczego procesu optymalizacji (str. 111) nie przeprowadzono dla CBD i THC. Zastanawiające jest też zastosowanie atrazyny, często wykorzystywanego wzorca kontrolnego dla produktów alkaloidowych lub syntetycznych aminowych (narokotyki) do oznaczeń kannabinoidów.

Techniczna i edytorska ocena rozprawy

Przedstawiona dysertacja posiada typową strukturę. Składa się ze 220 numerowanych stron, w skład których wchodzi szereg rysunków (niekiedy dość słabej jakości, np. **11** str. 29, **13** str. 56, 17 str. **58, 19** str. 59 uniemożliwiając dogłębniejsze ich przeanalizowanie) i niekiedy niezwykle rozbudowanych tabel. Niekiedy rysunki nie są wyczerpująco podpisane, np. **Rys. 14** str. 56. Dysertacja podparta jest bardzo dobrze dobranymi pozycjami literaturowymi (zajmującej niemal 20 stron dysertacji). Pierwsza część – *Wprowadzenie i część literaturowa* składa się z teoretycznego wstępu, wprowadzającego czytelnika w zagadnienia opisane w dysertacji. Jest to według mojej opinii dobra część pracy. Mogę tu stanowczo podkreślić, że opis kwestii regulacji prawnych, wprowadzenia do obrotu, oznakowania, bezpieczeństwa jak też i zafałszowania zostały wykonane wzorowo, mogą one stanowić w przyszłości fragment szerszych opracowań zarówno dla studentów kierunków technologii żywności i pokrewnych, ale też i dla osób praktycznie zajmujących się tymi zagadnieniami. Część *Cel pracy* został zarysowany klarownie, czytelnik nie ma wątpliwości co do zamierzeń, jakie Doktorantka obrała. Część *aparatura i odczynniki, metodyka badawcza* została napisana bardzo rzetelnie (niekiedy z wieloma, pozornie obciążającymi czytającego szczegółami). Jest to jednak przypadłość pracy analitycznej, każda opracowana metoda musi być odtwarzalna. Fragment *Dyskusja* jest napisany bardzo zwięźle, uwypuklając największy sukces badawczy i wdrożeniowy Doktorantki, tj. wdrożoną procedurę badawczą PB18. Jest ona szczegółowo i wyczerpująco przestawiona w suplemencie dystertacji i stanowi jej istotę.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
KATEDRA CHEMII ŻYWNOŚCI I BIOKATALIZY
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
tel. 071 3205-147; 694 647 222
e-mail: antoni.szumny@upwr.edu.pl • www.upwr.edu.pl/kch

Wnioski końcowe

Wymienione powyżej drobne uwagi krytyczne i edytorskie niedociągnięcia mają charakter marginalny i nie wpływają na wysoką jakość przedstawionej do recenzji pracy. Bardzo dobrze zaplanowany cel pracy został **zrealizowany**, a przedstawione wyniki są **podstawą wdrożenia metody analitycznej**. Praca doskonale łączy aspekty pracy teoretycznej i praktycznej.

Podsumowując stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Natalii Galant posiada **niebagatelną wartość merytoryczną** i zawierając bogaty materiał analityczny w obszarze określenia bezpieczeństwa żywności.

W mojej opinii dysertacja **spełnia** wszelkie kryteria **ustawowe, ilościowe i jakościowe**, stawiane rozprawom doktorskim, w tym realizowanych w trybie *doktoratu wdrożeniowego* i z pełnym przekonaniem składam do Przewodniczącej Rady Naukowej Dyscypliny Technologii Żywności i Żywnienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Pani prof. Dr hab. Magdaleny Rudzińskiej wniosek o dopuszczenie rozprawy do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU
KATEDRA CHEMII ŻYWNOŚCI I BIOKATALIZY
ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław
tel. 071 3205-147; 694 647 222
e-mail: antoni.szumny@upwr.edu.pl • www.upwr.edu.pl/kch