POLITECHNIKA POZNAŃSKA
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
INSTYTUT CHEMII I ELEKTROCHEMII TECHNICZNEJ
ZAKŁAD CHEMII OGÓLNEJ I ANALITYCZNEJ

dr hab. inż. Agnieszka Zgoła-Grześkowiak, prof. PP

Poznań, 01.12.2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Natalii Galant
pt. „Wdrożenie metod wykrywania leków i substancji psychoaktywnych w suplementach diety i produktach spożywczych" wykonanej pod kierunkiem
prof. dr hab. Agnieszki Piotrowskiej-Cyplik
w Katedrze Technologii Żywności Pochodzenia Roślinnego
Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

Podstawą wydania oceny jest pismo Przewodniczącego Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 1 października 2022 r. oraz uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu z dnia 26 maja 2022 r.

Dobór i znaczenie tematu

Rozwój metodyki oznaczania substancji psychoaktywnych oraz aktywnych składników leków w suplementach diety jest bardzo istotny, ponieważ mogą one stanowić zagrożenie dla zdrowia konsumentów. Suplementy są dostępne bez ograniczeń, a ich produkcja wymaga zaledwie zgłoszenia do Głównego Inspektoratu Sanitarnego. Przy ogromnej ilości zgłaszanych suplementów ich kontrola praktycznie nie istnieje, a zgłaszany skład suplementu często odbiega od rzeczywistego. Niejednokrotnie zdarza się, że dodawane są substancje, które mają zwiększyć skuteczność działania suplementu, lecz nie są one bezpieczne. Dzięki wszechobecnej reklamie po suplementy diety w ostatnim czasie sięga coraz większa rzesza ludzi. Wśród nich są zarówno osoby chore, jak i zdrowe, chcące uzupełnić w szybki sposób braki w diecie. Są oni przekonani, że sprzedawane im produkty są naturalne i w żaden sposób nie mogą im zaszkodzić. Tymczasem brak dostatecznej kontroli na rynku suplementów powoduje, że czasami oferowane im są produkty zafałszowane lub o niskiej jakości. Stąd tak istotne jest opracowanie szybkich metod analitycznych do kontroli zawartości substancji niedozwolonych w takich produktach.

Przedłożona do recenzji praca powstała na potrzeby wdrożenia w Laboratorium Instytutu Genetyki Sądowej ekonomicznych metod wykrywania i oznaczania jak najszerszego zakresu substancji psychoaktywnych oraz aktywnych składników leków w suplementach

diety. Stwierdzam, że wybór tematu rozprawy jest trafny i w pełni uzasadniony aktualnymi potrzebami zapewnienia bezpieczeństwa stosowania suplementów diety. Zastosowanie w badaniach wysokosprawnego chromatografu cieczowego sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas jest niewątpliwie dobrym wyborem z uwagi na możliwości oznaczania jednocześnie wielu związków na niskim poziomie stężeń, przy niecałkowitym rozdzieleniu chromatograficznym, lecz z dużą pewnością otrzymanych wyników, zarówno w analizie jakościowej, jak i ilościowej.

Struktura pracy – ocena formalna

Rozprawa doktorska ma klasyczny układ. W jej skład wchodzi wyodrębniona część literaturowa i doświadczalna, dyskusja wyników i wnioski. Łącznie praca została przedstawiona na 220 stronach (w tym 52 strony suplementu z tabelami). Zacytowanych zostało 155 źródeł literaturowych, 18 internetowych oraz 9 aktów prawnych. Rozprawa doktorska zaczyna się od wprowadzenia podkreślającego istotność podjętego tematu oraz części literaturowej opisującej szereg podstawowych informacji związanych ze stosowaniem suplementów diety (w tym o wielkości polskiego i światowego rynku sprzedaży), z wymaganiami prawnymi oraz z zafałszowaniem wielu produktów obecnych na rynku. Omówiono również zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas jako uniwersalnego narzędzia do oznaczania substancji psychoaktywnych oraz aktywnych składników leków w kontroli suplementów diety i produktów spożywczych. Część literaturowa została przedstawiona w sposób logiczny i przejrzysty oraz wzbogacona o 11 rycin i 2 tabele.

W dalszej części pracy przedstawiono jej cel, część doświadczalną z dokładnym opisem opracowania i walidacji metod, a także wyniki. Część zawierająca wyniki jest znacznie rozbudowana ze względu na ogromną liczbę oznaczanych związków oraz dwa rodzaje matrycy (stałą i olejową), dla których opracowano osobne metody analityczne. Przedstawiono też krótką dyskusję wyników i wnioski. W końcowej części rozprawy doktorskiej zamieszczone jest podsumowanie dorobku naukowego Doktorantki zawierającego cztery publikacje opublikowane w czasopismach z listy JCR oraz dwie prace wysłane do recenzji.

Ocena merytoryczna pracy

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska jest napisana w sposób przejrzysty i dobrze zorganizowany. Część literaturowa pracy została dobrze opracowana bazując na obszernym przeglądzie literaturowym, co dowodzi, że Doktorantka umiejętnie przestudiowała i przeanalizowała problematykę badawczą na podstawie dostępnego piśmiennictwa. Niewątpliwie ta część pracy stanowi właściwe wprowadzenie do części badawczej. W części doświadczalnej widoczny jest ogrom pracy włożony w opracowanie dwóch procedur analitycznych i ich pełną walidację. Podjęcie przez Doktorantkę wyzwania

oznaczenia w jednym przebiegu analitycznym około 500 związków jest imponujące, a otrzymane wyniki potwierdzają osiągnięcie celu. Opracowane procedury są bardzo krótkie, jak na tak dużą liczbę związków, zapewniając tym samym ekonomiczne wykorzystanie sprzętu wysokiej klasy, jakim jest wysokosprawny chromatograf cieczowy sprzężony z tandemowym spektrometrem mas.

Od strony językowej praca została napisana dobrze, choć w takich opracowaniach nie sposób uniknąć pewnych drobnych błędów edytorskich. Zamieszczone w części eksperymentalnej pracy rysunki są niestety kiepskiej jakości, co utrudnia ich interpretację. Podczas czytania rozprawy doktorskiej nasunęły mi się pewne uwagi, spostrzeżenia i pytania, które zamieszczam poniżej. Poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich w trakcie obrony pracy.

- W tytule pracy „Wdrożenie metod wykrywania leków i substancji psychoaktywnych w suplementach diety i produktach spożywczych" nie powinno znaleźć się sformułowanie „wykrywanie leków", ponieważ lek to produkt końcowy podawany pacjentowi, zawierający oprócz substancji aktywnej również substancje pomocnicze.
- W rozdziale 3 została zamieszczona rycina 11 przedstawiająca widmo kokainy. Natomiast w tekście nie pojawiło się odwołanie do niej, ani żadne informacje odnośnie trybu pracy spektrometru mas, z użyciem którego otrzymano widmo.
- W części eksperymentalnej szczegółowo opisano sposób przygotowania roztworów „mastermix" bez użycia kolb miarowych. Czy pozostałe roztwory wzorcowe (np. do sporządzenia krzywych kalibracyjnych) również przygotowywano w ten sposób?
- Dlaczego nie zastosowano w metodzie znakowanych izotopowo wzorców wewnętrznych? Wzorce te zapewniłyby zarówno kontrolę wpływu matrycy, jak i kontrolę czasu retencji. Tymczasem do kontroli czasu retencji wykorzystano pestycydy.
- Energia kolizji wyrażona jest w voltach, a powinna być w elektronowoltach.
- W punkcie 5.2.1 wśród optymalizowanych parametrów wspomniany jest potencjał wejścia jonów do komory kolizyjnej. Dlaczego w pracy nie przedstawiono optymalizacji tego parametru i przyjęto go na stałe jako 10 V?
- Nazwy związków w tabelach 4 i 10 powinny być napisane w języku polskim. Pojawiające się skróty nazw powinny zostać wyjaśnione, np. w formie spisu zamieszczonego w suplemencie.
- Dwa z oznaczanych związków ulegają jonizacji w trybie ujemnym. Czy związki te były oznaczane równocześnie z pozostałymi, czy w osobnym przebiegu analizy? Nie zauważyłam piku pochodzącego od GHB przy czasie retencji około 1,34 minuty na chromatogramie (rycinie 24.) W podpisie jest informacja, że jest to chromatogram wszystkich 502 związków.
- Na rycinie 24 zauważyłam, że związki eluujące do 4 minuty są silnie zniekształcone. Co może być tego przyczyną oraz jaki to ma wpływ na ich oznaczanie?

- W punktach 6.3 i 7.3 zamieszczono opisy izolacji analitów z matrycy. Niestety brakuje szczegółowego opisu sposobu, w jaki matryce zostały wzbogacone w celu sprawdzenie odzysków oznaczanych związków.
- Dlaczego zgodnie z opisem w punkcie 6.4.4. zakres roboczy krzywej kalibracyjnej to 0,1-10 ng/ml, jeśli granica oznaczalności zgodnie z punktem 6.4.3. to 0,5 ng/ml, a więc pięciokrotnie więcej niż najniższy punkt na krzywej?
- W punkcie 6.5 znajduje się weryfikacja metody analitycznej. Niestety przeprowadzona jest tylko na zasadzie wykrycia, a nie oznaczenia związków. Stosowana matryca jest odmienna od zwalidowanej. Czy to jest odpowiednia weryfikacja opracowanej procedury analitycznej?
- W tabeli 10 brakuje informacji o tym, czy zakupione do badań tabletki były powlekane, czy nie? Przy homogenizacji tabletek powlekanych w moździerzu zastosowana odważka 10 mg nie zapewnia powtarzalności.
- Na chromatogramie (rycina 29) pik CBDA jest podwójny. Z czego to wynika i jaki ma to wpływ na analizę ilościową?
- Dlaczego ostatnie piki na chromatogramach na rycinach 29 i 30 znajdują się w czasie retencji przewidzianym do stabilizowania kolumny analitycznej?
- W rozdziale zatytułowanym Wnioski nie wszystkie punkty w nim zawarte są wnioskami. Jest tam wiele podsumowań wykonanej pracy. Rozdział powinien być inaczej zatytułowany, np. Podsumowanie i wnioski.
- Dlaczego wg opisu na stronie 220 w pracy stosowano metanol, acetonitryl i izopropanol o czystości do HPLC, a nie do LC-MS? Natomiast odczynniki wymienione w załączonych procedurach badawczych są o czystości LC-MS.
- W jaki sposób zweryfikowano, że roztwory wzorców analitycznych przechowywane w zamrażarce w temperaturze -20°C są trwałe przez 10 lat od daty przygotowania?

Podsumowując, Autorka opracowała dwie metody analityczne mające zastosowanie dla różnych matryc, wymagające od niej dużej wiedzy, umiejętności i zaangażowania. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zawiera procedury, które zapewnią weryfikację bezpieczeństwa stosowania suplementów diety obecnych na polskim rynku. Przez to wartość aplikacyjna przedłożonej do oceny rozprawy doktorskiej jest znacząca, a zamieszczone w niniejszej recenzji uwagi mają na celu jedynie doskonalenie warsztatu naukowego Doktorantki.

Podsumowanie i wniosek końcowy

W podsumowaniu recenzowanej pracy doktorskiej Pani mgr Natalii Galant stwierdzam, że Doktorantka we właściwy sposób zaplanowała i przeprowadziła prace eksperymentalne mające na celu opracowanie metod oznaczania substancji psychoaktywnych oraz aktywnych składników leków w suplementach diety. Przedstawiona do oceny praca doktorska wymagała od Doktorantki sporego zaangażowania i umiejętności. Podjęcie tematu pracy

doktorskiej uważam za celowe i uzasadnione, a uzyskane wyniki mają ogromne znaczenie aplikacyjne.

Reasumując, rozprawa doktorska Pani mgr Natalii Galant spełnia wymagania Ustawy z dnia 20 lipca 2018 Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018, poz. 1668) konieczne do uzyskania stopnia naukowego doktora. Zatem wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Technologia Żywności i Żywienia Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu o dopuszczenie Pani mgr Natalii Galant do dalszych etapów przewodu doktorskiego i publicznej obrony.

Agnieszka Zgoła-Grześkowiak

dr hab. inż. Agnieszka Zgoła-Grześkowiak, prof. PP