

**Prof. dr hab. Henryk Jeleń**  
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

## RECENZJA

**rozprawy doktorskiej mgr Juana Manuela Molina-Ruiz**

**pt. „Development of method for the determination of pesticides in food with high fat content” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Ewy Cieślik na Wydziale Technologii Żywności, Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.**

Recenzja składa się z oceny następujących elementów:

1. Dobór i znaczenie tematu
2. Układ pracy, bibliografia, wymogi formalne
3. Koncepcja rozwiązania problemu naukowego
4. Zastosowana metodyka badań
5. Przedstawione wyniki i prawidłowość wnioskowania
6. Ocena końcowa

### **Ad.1) Dobór i znaczenie tematu**

Analityka pozostałości pestycydów jest jednym z dominujących zagadnień obszaru analizy żywności skupiającej się na zanieczyszczeniach, substancjach obcych i toksycznych. Wraz z rozwojem technik analitycznych możliwe jest oznaczenie pozostałości pestycydów na coraz niższych poziomach i z coraz większą dokładnością. Postęp w chromatografii gazowej, cieczowej oraz spektrometrii mas, a w szczególności tandemowej spektrometrii mas pozwolił na opracowanie szeregu metod analitycznych pozwalających na oznaczenie w jednym przebiegu nawet kilkuset związków na poziomach ppb. Najtrudniejszym zagadnieniem w analizie pozostałości pestycydów w żywności jest problematyka prawidłowego przygotowania próbek do analizy. Jest to etap najbardziej pracochłonny, będący jednocześnie największym źródłem błędów w całym procesie analitycznym. Z uwagi na różnorodność matryc, w których oznaczane są pozostałości pestycydów, przygotowanie próbek jest często bardzo specyficzne, uwzględniające cechy charakterystyczne produktów (matryc), głównie obecność substancji utrudniających izolację i identyfikację pestycydów (duża zawartość barwników, cukrów, tłuszczów, kwaśny odczyn produktów).

Pomimo dużej liczby prac dotyczących oznaczania pozostałości pestycydów, tematyka ta jest wciąż rozwijana i aktualna, z uwagi na uwarunkowania legislacyjne, oraz pojawiające się nowe metody identyfikacji i kwantyfikacji pestycydów, a także nowe metody przygotowania

próbek. Najbardziej istotną metodą, a raczej podejściem analitycznym ostatnich lat jest metoda QuEChERS (733 dokumenty w bazie Web of Knowledge z wyrazem QuEChERS w temacie), pozwalająca na uproszczenie i przyspieszenie procesu przygotowania próbek do analizy.

Zadanie, które postawił przed sobą doktorant jest niewątpliwie ważne dla analityki żywności, czego wyrazem jest znaczna liczba prac publikowanych z oznaczania pestycydów w matrycach o dużej zawartości tłuszczu, wybranych do pracy doktorskiej (np. 72 prace w bazie Web of Knowledge zawierające w tytule „oilve” i „pesticides”, 34 zawierające w tytule „carp” i „pesticides”. Podjęcie takiego tematu pracy, w świetle aktualnych badań i potrzeb przemysłu i laboratoriów kontrolnych uważam za zasadne, jednocześnie zdając sobie sprawę z tego jak trudno w tego rodzaju pracy o nowość naukową.

#### **Ad. 2) Układ pracy, bibliografia, wymogi formalne**

Przedstawiona do oceny praca obejmuje 171 stron maszynopisu w języku angielskim: 55 stronicową część teoretyczną, 30 stronicową część metodyczną, oraz 19 stronicową część opisującą wyniki, po której następuje 20 stronicowa dyskusja, 4 stronicowy rozdział poświęcony aplikacjom i 4 strony wniosków. Cytowane piśmiennictwo obejmuje 167 pozycji. W pracy zamieszczono także 28 tabel, 39 rycin i wykresów oraz 11 fotografii.

Część teoretyczną rozpoczyna rozdział poświęcony pestycydom. Przedyskutowano w nim w zwięzłej formie definicje (FAO, EPA, CA), podział oraz aspekty legislacyjne. W sposób jasny i obrazowy przedstawiono problematykę najwyższych dopuszczalnych poziomów pozostałości (pestycydów) (MRL) oraz zagrożenia zdrowia i życia powodowane przez pestycydy. Rozdział pierwszy, dotyczący pestycydów stanowi dobre i zwięzłe wprowadzenie czytelnika w problematykę pracy. Rozdział drugi poświęcono analizie pestycydów, w szczególności problematyce oznaczania tych związków w matrycach o dużej zawartości tłuszczu. Przedstawiono podstawowe techniki ekstrakcyjne wykorzystywane w wyodrębnianiu pestycydów z matrycy, podkreślając ich mocne i słabe strony. W kolejnym podrozdziale omówiono techniki oczyszczania i wzbogacania próbek, w odniesieniu głównie do próbek o dużej zawartości tłuszczu. W sposób bardzo szczegółowy omówiono ekstrakcję do fazy stałej (SPE) jako metodę najczęściej wykorzystywaną do oczyszczania próbek/zagęszczania analitów. W kolejnym podrozdziale autor scharakteryzował techniki wykorzystywane do identyfikacji i kwantyfikacji pestycydów. Z uwagi na charakter tych związków, do ich analizy wykorzystywana jest zarówno chromatografia gazowa, jak i cieczowa. Autor przedstawił w sposób zwięzły ale wyczerpujący problematykę poprawnej identyfikacji oznaczanych związków, szczególnie uwzględniając zalecenia SANCO i kryteria punktowe stosowane w spektrometrii mas. Szkoda, że wyjątki z tych zaleceń odnoszące się do LRMS, HRMS, MS/MS nie znalazły się w pracy w formie tabelki (Comission Decision C(2002 3044), 2002/657/EC). Autor poświęcił także podrozdział efektom matrycy

obserwowalnym w analizie pestycydów podając sposoby ich niwelowania bądź minimalizowania. W części poświęconej aspektom analitycznym autor szczegółowo omówił metodę QuEChERS, będącą wariantem dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (d-SPE). Metoda QuEChERS (z licznymi wariantami) od momentu opisanego przez Anastassiadesa i współpracowników (2003) stała się intensywnie eksploatowanym obszarem przygotowania próbek. Doktorant w szczególności omówił zasady metody, jej zalety i modyfikacje uwzględniające specyfikę różnych matryc. Zakończeniem części teoretycznej jest krótki rozdział opisujący matryce będące przedmiotem zainteresowania autora rozprawy (oliwki, rzepak, avocado, produkty drobiowe i ryby).

W mojej opinii część teoretyczna jest napisana w sposób bardzo przejrzysty i jasny, w wystarczająco obszerny sposób przybliży czytelnikowi tematykę pracy.

*Uwagi:*

- *W oczy rzuca się niejednorodny sposób cytowania materiałów źródłowych – raz są to wymienieni wszyscy autorzy, innym razem tylko pierwszy autor (i in.).*
- *W pozycji 77 powinno być podane, że jest to rozdział w książce (Handbook of Food Analytical Instruments, Semih Ötles (Red.))*
- *W pozycji 78 błędnie podano datę publikacji książki (powinno być 2007)*
- *Szkoda, że autor nie podał opisując w ostatnim rozdziale rodzaj materiału badanego/matrycy, jakie pestycydy są największym problemem w tych matrycach z uwagi na częstotliwość stosowania, przekroczenia norm i charakter analizowanych związków.*

### **Ad 3) Koncepcja rozwiązania problemu naukowego**

Autor postawił sobie za cel opracowanie metod ekstrakcji i optymalizację metody oznaczania pestycydów w matrycach bogatych w tłuszcz. Założeniem autora było opracowanie metod opartych na dyspersyjnej SPE/QuEChERS, które pozwoliłyby na skrócenie czasu analizy i uproszczenie procedury analitycznej. Autor założył przeprowadzenie dwuetapowych eksperymentów, gdzie drugi etap ma się opierać na modyfikacji pierwszego dla niektórych matryc. Jako metodę separacji i identyfikacji pestycydów autor zdecydował się na wykorzystanie chromatografii gazowej w połączeniu ze spektrometrią mas (z użyciem analizatorów typu pułapki jonowej i analizatora kwadrupolowego). Proponowane podejście analityczne w ogólnym zarysie mieści się w standardowym sposobie postępowania w tego rodzaju pracach.

### **Ad 4) Zastosowana metodyka badań**

Jako matryce w których oznaczano pozostałości (dodanych) pestycydów autor wykorzystał: *i)* oliwki (odmiana uprawowa *Picual*) w różnym stopniu dojrzałości, pochodzące z Hiszpanii, o zawartości tłuszczu 20-24% w zależności od terminu zbioru, *ii)* nasiona rzepaku dwóch odmian *Digger* i *Nelson* (o zawartości tłuszczu 42%), *iii)* trzy odmiany avocado (*Fuerte*, *Reed* i *Hass*) pochodzące z Hiszpanii o różnym stopniu dojrzałości, a tym samym zawartości tłuszczu (7 – 19%), *iv)* wątróbki drobiowe o średniej zawartości tłuszczu 5% oraz *v)* mięso

ryb (karp i jesiotr ostronosy, o zawartości tłuszczu odpowiednio 6 i 15%). Zawartość pestycydów w materiale badanym sprawdzono w certyfikowanym laboratorium.

W części metodycznej pracy przedstawiono warianty poszczególnych testów w pierwszej serii eksperymentów (str. 75, testy 1-4) oraz drugiej serii (str. 76, testy 5 i 6). W testach tych wykorzystano różne kombinacje rozpuszczalników do ekstrakcji i sorbentów (Ryc. 10 i 11). Projekt doświadczeń wydaje mi się dość chaotyczny a dobór sorbentów i kolejność ich stosowania dość przypadkowa. (np. z czego wynikało zastosowanie różnych rozpuszczalników i sorbentów do ekstrakcji pozostałości pestycydów z awokado i oliwek – podobna zawartość tłuszczu i jego postać - TAG). To samo dotyczy eksperymentu 2. Chociaż w tabeli 7 podano ogólne charakterystyki sorbentów, to w części metodycznej pracy brakuje w mojej opinii merytorycznego uzasadnienia doboru rozpuszczalników i sorbentów do badanych matryc. Przed ich doбором autor powinien określić na podstawie m. in. danych literaturowych, jakie substancje interferujące będą stanowiły najistotniejszy problem w oczyszczaniu próbek i pod tym kątem dobrać sorbent (uwzględniając specyfikę materiału i barwników roślinnych, specyfikę materiału zwierzęcego, różnice we frakcjach tłuszczowych materiału roślinnego i zwierzęcego). Wymieniony przez autora jako nowy/nowatorski (?) etap wymrażania (freezing-out, str. 75) wykorzystywany jest w rozdzielaniu faz w czasie ekstrakcji od dawna. Autor pisze, że liczba oznaczanych pestycydów była różna w zależności od programu GC-MS i zawartości pestycydów w dostępnych roztworach standardów (?). W tabeli 9 podano 19 pestycydów oznaczanych w badanych matrycach w teście 1. Nie podano informacji, które z nich stanowią największy problem jeśli chodzi o częstotliwość występowania w poszczególnych matrycach (oliwki, rzepak). Czym powodowany był rozszerzony z 19 do 29 związków skład mieszaniny pestycydów, którymi wzbogacano matrycę w teście drugim (tabela 10)? W teście trzecim, piątym i szóstym analizowano 24 pestycydy, czwartym – 27.

*Uwagi:*

- *Na chromatogramach zamieszczonych na rycinie 14 i 19 nie podano osi czasu i intensywności sygnału.*
- *Czy na rycinie 10 nie podano błędnie rozpuszczalników stosowanych do ekstrakcji (eksperyment 3 i 4 – rozbieżności z tekstem)?*
- *Na stronie 81 (Test 1) podano, że analizy prowadzono w trybie SCAN natomiast w tabeli 9 (str. 82) podano jony używane w trybie SIM*
- *Nie podano w części metodycznej, czy krzywe standardowe wykreślono dla wzbogaconej matrycy, czy czystego rozpuszczalnika*

**Ad 5) Przedstawione wyniki i prawidłowość wnioskowania**

Wyniki ujęto w podrozdziałach opisujących poszczególne testy w ramach eksperymentu I oraz II. W teście 1 odzyski pestycydów dla większości mieściły się w przedziale 70-120% przy RSD <17% (dla 20mg/kg). Zaobserwowano wzrost odzysków przy rosnącej ilości sorbenta użytego do oczyszczania. Obserwacja ta występowała także w innych testach. W

tabeli 16 opisującej parametry metody opracowanej do oznaczania zawartości pozostałości pestycydów w oliwkach i rzepaku podano tylko parametry krzywej standardowej, nie podano granic wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) metody. W teście 2, w tabeli 18 ujęto podstawowe parametry kalibracyjne metody. Spośród kombinacji sorbentów najlepsze rezultaty otrzymano dla PSA + SAX. W mojej opinii dodane stężenia pestycydów w badaniu odzysków powinny bardziej się od siebie różnić (niż badane 0.010 i 0.020mg/kg, podobnie w teście 3 dodane pestycydy w stężeniach 0.010 i 0.030mg/kg). W teście 4 otrzymano podobne wyniki przy ekstrakcji acetonitrylem i octanem etylu, uzyskując granice oznaczalności znacznie niższe niż MRL. We wszystkich modyfikacjach metod opracowanych przez autora granice oznaczalności cechują się wartościami niższymi od MRL.

W teście 5 wprowadzono dodatkowy etap oczyszczania ekstraktów z oliwek i rzepaku, prowadząc detekcję i analizę ilościową za pomocą dwóch rodzajów spektrometrów – pułapki jonowej i spektrometru kwadropolowego, gdzie oba aparaty pracowały w trybie SIM. W tabeli 24 podano granice wykrywalności i oznaczalności badanych pestycydów otrzymując dla pułapki jonowej, jak i analizatora kwadropolowego bardzo zbliżone wartości, znacznie niższe niż wartości MRL dla oliwy i rzepaku. Jednocześnie na chromatogramach 21 i 22 przedstawiono mieszaninę standardów pestycydów o tym samym stężeniu, analizowanych na tych aparatach. Chromatogramy te znacznie różnią się stosunkiem sygnału do szumów dla poszczególnych pików, w świetle czego podobne granice oznaczalności uzyskane za pomocą obu aparatów wydają się trudne do wytłumaczenia. Wydaje mi się, że niepotrzebnie autor zamieszczał porównanie odzysków oznaczonych na dwóch typach aparatów. O ile obydwa aparaty mogą różnić się czułością, to wyznaczone odzyski, przy zachowaniu dobrej praktyki laboratoryjnej powinny być na obu aparatach zbliżone.

Wyniki badań zostały podsumowane w części dyskusyjnej, która w mojej opinii została dość dobrze i wyczerpująco napisana. Autor tłumaczy różnice w odzyskach niektórych pestycydów w oliwkach i nasionach rzepaku właściwościami sorbentów, a także różnicami w składzie olejów – skwalenem w oliwie z oliwek i składem kwasów tłuszczowych. Autor zaobserwował wpływ wzrostu dodatku wszystkich sorbentów na usuwanie substancji interferujących w oznaczaniu pestycydów z tych matryc. Dość ciekawym jest duży wpływ kwasu linolowego na czystość ekstraktu i jego słaba adsorpcja na złożach, podczas gdy dominującym kwasem tłuszczowym zarówno w oliwie z oliwek, jak i oleju rzepakowym jest kwas oleinowy i należałoby się spodziewać większych problemów z usuwaniem właśnie tego kwasu. W sposób wnikliwy autor odniósł się do danych literaturowych dotyczących m. in. zawartości pestycydów w mięsie ryb. Odnosząc się do metod opisywanych w literaturze autor podkreśla wypracowane nowe podejście w analizie dyspersyjnej SPE – tzw. „dual-d-SPE clean up”, choć mam wątpliwości czy dwukrotne, sekwencyjne stosowanie sorbentów można już zakwalifikować jako nowe podejście w d-SPE. W całej dyskusji wyników w

wyczerpujący sposób autor odniósł się do wyników literaturowych dotyczących badań pozostałości pestycydów w takich samych, lub zbliżonych matrycach. W podsumowaniu dyskusji autor podkreśla różnice w opracowanym podejściu analitycznym w porównaniu do „tradycyjnej” metody QuEChERS wskazując na korzyści w stopniu oczyszczenia ekstraktu wykorzystując sekwencyjnie złoża (PSA+GCB+C18) + SAX+C18) i stosowane przez innych autorów wymrażanie. Nowatorskie w opinii autora podejście do analizy pestycydów proponowanymi metodami znajdzie ostateczne potwierdzenie w publikacjach będących wynikiem tej pracy.

W ostatnim rozdziale pracy znalazły się dane literaturowe dotyczące matryc wykorzystywanych przez autora w swoich badaniach. Informacje te, jak sugerowałem mogłyby znaleźć się w części literaturowej pracy w ostatnim rozdziale poświęconym materiałowi badanemu.

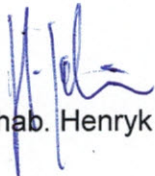
*Uwagi:*

- *Str. 108 autor raz pisze o pisze o krzywych standardowych sporządzonych w acetonitrylu a także w octanie etylu, lub o heksanie i octanie etylu.*

#### **Ad 6) Ocena końcowa**

Rozprawę doktorską pana mgr Juana Manuela Molina-Ruiz oceniam jako wartościową pod względem naukowym, zawierającą elementy nowości naukowej, dobrze zredagowaną, szczególnie w części teoretycznej. Uwagi i sugestie wymienione powyżej nie wpływają na jednoznacznie pozytywną ocenę pracy. Na podkreślenie zasługuje wybór określonego rodzaju matrycy (o dużej zawartości tłuszczu) o zróżnicowanym charakterze (materiał roślinny i zwierzęcy), wymuszający stosowanie zróżnicowanego podejścia w doborze rozpuszczalników i sorbentów w procesie przygotowania próbek. Stosowanie sekwencyjnego oczyszczania na złożach pozwoliło na otrzymanie ekstraktów o zadawalającej czystości umożliwiających oznaczanie wybranych pestycydów na niskich poziomach. Autor pracy wykazał się znajomością warsztatu analitycznego zarówno w obszarze przygotowania próbek, jak i analizy za pomocą GC/MS tych związków.

Stwierdzam, że oceniana przez mnie rozprawa spełnia wszystkie wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Wydziału Technologii Żywności Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie o dopuszczenie pana mgr Juana Manuela Molina-Ruiz do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.

  
Prof. dr hab. Henryk Jeleń