

Prof. dr hab. Eugeniusz R. Grela
Instytut Żywienia Zwierząt i Bromatologii
Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

R e c e n z j a

pracy doktorskiej pt. "**Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności**", wykonanej przez panią mgr **Ewelinę Kowalczyk** w Zakładzie Higieny Pasz Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach.

W działalności analitycznej dąży się do wprowadzenia coraz to nowszych i dokładniejszych metod oznaczania składników biologicznie czynnych w paszach i żywności. Opracowanie i wdrożenie odpowiednich procedur analitycznych w celu zapewnienia wysokiej dokładności w oznaczaniu ilościowym i jakościowym różnych związków szkodliwych, przyczynia się do bezpieczeństwa wytwarzanych środków żywienia dla ludzi i zwierząt. Rozwój nowych technik analitycznych pozwala identyfikować i wykrywać różne związki, w tym groźne dla zdrowia alkaloidy pirolizydynowe. Stąd też uważam za słuszne i w pełni uzasadnione badania nad opracowaniem metod wykrywania i oznaczania wybranych alkaloidów w miodach i materiałach paszowych z wykorzystaniem technik chromatograficznych, zarówno gazowych jak i cieczowych.

Ocena formalna dysertacji

Rozprawę doktorską pani mgr Eweliny Kowalczyk stanowi 5 prac współautorskich, opublikowanych w czasopismach ujętych w bazie JCR o łącznym IF w roku wydania prac = 6,11 i punktacji wg MNiSzW 105 pkt. Prace zostały opublikowane w uznanych czasopismach jak Journal of Veterinary Research (2), oraz po jednej w Food Analytical Methods, Food Additives nad Contaminants oraz Medycynie Weterynaryjnej w latach 2015-2018. We wszystkich 5 pracach pani mgr Ewelina Kowalczyk jest pierwszym, zatem wiodącym autorem, zaś drugim lub trzecim autorem jest Jej promotor w osobie prof. dr hab. Krzysztofa Kwiatka. W dwóch pracach pozostałym współautorem umiejscowionym na drugim miejscu jest promotor pomocniczy p. dr Zbigniew Sieradzki lub współpracownik z Zakładu, pani dr Ewelina

Patyra. Kopie wszystkich prac zostały dołączone do manuskryptu, w którym pomieszczono: Wstęp – 9 stron, Cel i zakres pracy – 1 str., Materiał i metody – 2 str., Wyniki – 16 str., Wnioski – 1 str., Streszczenie w języku polskim i angielskim – 3 str. oraz Bibliografię – 55 pozycji na 5 stronicach.

Z dołączonych oświadczeń współautorów o ich roli i udziale w publikacjach wynika, że p. mgr Ewelina Kowalczyk jest wiodącym autorem, a Jej udział w poszczególnych publikacjach wynosi aż 90-95%. Wkład ten polegał na realizacji badań, analizie wyników, opracowaniu wprowadzenia do każdej publikacji, sporządzeniu opisu wyników i dyskusji, sformułowaniu wniosków, redakcji manuskryptów oraz korekty artykułów po recenzjach. Podkreślić należy dużą ilość artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej oraz krótki okres ich publikowania – 4 wiodące prace ukazały się w 2017 i 2018 roku. Świadczy to o dużym zaangażowaniu Doktorantki w realizację badań oraz sprawności w opracowywaniu uzyskanych wyników, umiejętności konfrontowania ich z rezultatami dostępnymi w literaturze fachowej oraz opracowywania oryginalnych prac twórczych. Potwierdza to dobre przygotowanie Doktorantki do dalszej pracy naukowo-badawczej. Mając powyższe na uwadze, stwierdzam, że formalna strona przedstawionej rozprawy nie budzi żadnych zastrzeżeń.

Jedynie w załączonej dokumentacji zabrakło podpisanej przez współautorów zgody na wykorzystanie tych publikacji do dysertacji doktorskiej.

Mam też drobną uwagę do tytułu rozprawy, a zwłaszcza słowa „żywności”, przecież zajmowano się tylko miodem i tak jest w tytułach prac 3 i 4 wykazu publikacji składających się na dysertację doktorską.

Ocena merytoryczna dysertacji

Oceniana praca osadzona jest w obrębie nauk weterynaryjnych, dotyczących opracowania i walidacji metod oznaczania niektórych ksenobiotyków, które stanowią mogą istotny aspekt w kontroli bezpieczeństwa pasz i żywności. Opublikowane prace jak również manuskrypt, stanowiący przewodnik całej dysertacji wskazują na ważkość podjętej problematyki tak z punktu naukowego jak i znaczenia praktycznego. Dysertacja doktorska jest dobrze umocowana w światowym piśmiennictwie (oprócz

cytować w poszczególnych publikacjach podano w manuskrypcie 55 pozycji, w tym 54 w języku angielskim), przy czym 21 cytowanych prac została opublikowana po roku 2014. Cele badawcze, weryfikowane w badaniach opisanych szczegółowo w poszczególnych publikacjach, są sformułowane jasno i precyzyjnie. Co jest istotne, Doktorantka sformułowała także w części opisowej manuskryptu uogólnione hipotezy badawcze oraz cel, wspólne dla całego cyklu doświadczeń. Takie sformułowanie należy uznać za trafne i precyzyjne, gdyż mimo szerokiego zakresu badań, podkreśla spójność koncepcji badawczej.

Wstęp manuskryptu, a właściwie to przegląd piśmiennictwa z 5 podrozdziałami (toksyczność, zatrucia, ich objawy i diagnostyka, rekomendowane maksymalne dzienne pobranie, zalecenia oraz metody oznaczania alkaloidów pirolizydynowych (AP) w paszach i żywności) stanowi wprowadzenie w problematykę właściwości AP i możliwości ich wykrywania w środkach żywienia ludzi i zwierząt. Autorka w dość klarowny sposób przybliżyła zagadnienia dotyczące charakterystyki tych alkaloidów i możliwości ich oznaczania z wykorzystaniem metod chromatograficznych, głównie cieczerwowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. To z kolei pozwoliło Autorce na sformułowanie celu i zakresu projektowanych i wykonanych badań odnośnie opracowania i walidacji procedur analitycznych oznaczania alkaloidów pirolizydynowych. Ponadto Autorka wskazała zakres prac wykonanych i opisanych w poszczególnych publikacjach, co pozwala adwersarzowi tej dysertacji na jednoznaczne odniesienie się do merytorycznej oceny zaprezentowanych wyników badań. Podjęte zatem przez mgr Ewelinę Kowalczyk badania, dotyczące optymalizacji warunków oznaczania wybranych alkaloidów pirolizydynowych oraz zastosowanie opracowanych metod do oznaczania AP w paszach i miodach oraz ocena bezpieczeństwa zbadanych produktów, uważam więc za celowe i aktualne, legitymujące się też praktycznym aspektem zastosowania tych osiągnięć w analityce laboratoryjnej.

Rozdział manuskryptu „Materiał i metody” dość dobrze opisuje materiał użyty do badań oraz wykonanych procedur analitycznych i pomiarów doświadczalnych. Badania pasz wykonano na 69 próbkach (37 metodą GC-MS i 32 metodą LC-MS), zaś dla miodów przebadano łącznie 104 próbki (54 metodą GC-MS i 50 metodą LC-MS).

Należy też podkreślić, że zastosowane odczynniki, aparatura i sprzęt laboratoryjny oraz kryteria oceny i metody analityczne są odpowiednie i w pełni nowoczesne w tego typu badaniach. Autorka wiele czasu poświęciła na dopracowanie innowacyjnych metod ekstrakcji AP z poszczególnych próbek pasz i miodów do oznaczeń chromatograficznych. Poświadczeniem tej oceny są publikacje w uznanych czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym.

Szczegółowe wyniki badań wraz z dyskusją zostały przedstawione w załączonych 4 pracach, stanowiących istotę dysertacji doktorskiej. W przesłanym manuskrypcie Autorka dokonała krótkiej, ale bardzo interesującej rekapitulacji wyników swoich badań. Rozdział ten bardzo klarownie informuje o prowadzonych procedurach analitycznych (4 ryciny ukazujące schematy postępowania przy metodach GC-MS i LC-MS w paszach i miodach) i uzyskanych wynikach badań własnych. Dotyczyły one ustalenia warunków analizy i optymalizacji metod wykrywania oraz oznaczania AP w wybranych paszach i miodach, a także opracowania i walidacji procesów badawczych.

Z przedstawionej dyskusji w poszczególnych publikacjach oraz manuskrypcie, a zwłaszcza wniosków wynika przesłanie, że opracowane i poddane walidacji metody oznaczania alkaloidów pirolizydynowych technikami chromatografii gazowej i cieczowej sprzężonymi ze spektrometrią mas spełniają wymagania stawiane metodom analitycznym, a tym samym mogą być wykorzystywane do badania pasz i żywności pod kątem ich zawartości. Dużą dozę optymizmu wnoszą informację, że stężenia AP stwierdzone w materiałach paszowych nie powinny stanowić zagrożenia wywołania zatruc ostrych oraz transferu alkaloidów do żywności zwierzęcego pochodzenia, jak też w większości ze zbadanych miodów nie powinny przyczyniać się do przekroczenia rekomendowanego maksymalnego dziennego pobrania AP w przypadku spożycia do 20 g miodu dziennie, tym samym nie powinny stanowić podwyższonego ryzyka dla dorosłych konsumentów. Jednak zagrożenia dla zwierząt, zwłaszcza młodych mogą wynikać ze spożywania zanieczyszczonej paszy przez dłuższy okres czasu, natomiast przy miodach konieczne jest zwrócenie bacznej uwagi przy podawaniu dzieciom miodów azjatyckich.

Podkreślając trafność sformułowania założeń i celu badań, zauważyć należy rzeczowe, bardzo staranne i wykonane z dużym nakładem pracy i osobistego zaangażowania badania analityczne. Zarówno szeroki profil badań jaki i duża liczba oznaczeń pozwoliły Autorce rozprawy na uchwycenie istotnych zależności dotyczących oznaczania AP w niektórych paszach i miodach. Tak duża ilość oznaczeń laboratoryjnych mogła być wykonana przez doktorantkę jedynie dzięki Jej pilności, zaangażowaniu i pracowitości oraz zapobiegliwości i staraniom Promotora oraz koleżeńskiej atmosferze pracy w Zakładzie Higieny Pasz tutejszego Instytutu.

Przedstawiona do oceny praca, obok szeregu oryginalnych i istotnych dla nauki i praktyki rezultatów, zaowocowała opracowaniem czterech procedur badawczych do zastosowania w wykrywaniu AP w paszach i miodach, wykazanych w ocenianej dysertacji jako załączniki (publikacje 2-5). Autorka konkluduje także, że konieczna jest kontynuacja badań w zakresie oznaczania i występowania alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności.

Podsumowanie opinii

Z wielką satysfakcją pragnę podkreślić, że zarówno poszczególne publikacje jak też manuskrypt rozprawy doktorskiej pt. **„Zastosowanie technik chromatograficznych do analizy alkaloidów pirolizydynowych w paszach i żywności”** autorstwa pani mgr Eweliny Kowalczyk z uwagi na zaprezentowany poziom naukowy, aktualność problematyki i wartości poznawcze uzyskanych w badaniach wyników, ujęcie metodyczne i właściwy dobór metod analitycznych oraz oparcie wysuniętych wniosków na dość obszernym materiale eksperymentalnym, odpowiada wymogom stawianym pracom doktorskim (ustawa z dnia 14.03.2003 o stopniach i tytule naukowym oraz stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki - Dz. U. nr 65, poz. 595, ze zmianami w Dz. U. z 2005 roku nr 164, poz. 1365 oraz Dz. U. z 2011 r. nr 84, poz. 455 oraz Dz. U. z 2014 r. poz. 1198) i może być podstawą do nadania stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk weterynaryjnych. Publikacje naukowe, stanowiące podstawę rozprawy, stanowią cenne źródło wiedzy, zarówno w aspekcie naukowym jak i aplikacyjnym.

W związku z powyższym przedkładam Wysokiej Radzie Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach wnioski o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie pani mgr Eweliny Kowalczyk do dalszego etapu przewodu doktorskiego.

Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy pani mgr Eweliny Kowalczyk nagrodą dyrektora Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Swoją propozycję uzasadniam oryginalnym opracowaniem ważnych dla kontroli procedur badawczych dotyczących oznaczania zawartości alkaloidów pirolizydynowych w wybranych paszach i miodach techniką chromatografii gazowej i cieczowej z spektrometrią mas oraz opublikowaniem tych badań w uznanych czasopismach ze znaczącym współczynnikiem wpływu IF: *Journal of Veterinary Research, Food Analytical Methods i Food Additives and Contaminants* w latach 2017-2018.

Lublin, 28.08.2018 r.



.....
/Eugeniusz R. Grela/