



UMCS
UNIWERSYTET MARII CURIE-SKŁODOWSKIEJ

Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

Wydział Chemii,

Plac Marii Curie-Skłodowskiej 2

20-031 Lublin



Tel. +48 81 537 5704

Fax: +48 81 533-33-48 e-mail: ryszard.dobrowolski@mail.umcs.pl

Prof. dr hab. Ryszard Dobrowolski
Katedra Chemii Analitycznej

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ

pt.: „Ocena zawartości arsenu i jego form specjacyjnych w rybach i owocach morza”

Podstawą wykonania recenzji jest uchwała Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach podjętej w dniu 16.09.2016 r. i pismo Przewodniczącego Komisji Doktorskiej prof. dr hab. Dariusza BEDNARKA, które otrzymano 5.05.2023 r.

Uwagi wstępne

Właściwości toksyczne danego pierwiastka ściśle zależą od formy chemicznej, w jakiej występuje on w żywności różnego pochodzenia. Cechy te sprawiają, że istnieje duże zapotrzebowanie na czułe metody analityczne, pozwalające na identyfikację tych form i ich ilościowe oznaczenie. Analiza specjacyjna jako metoda identyfikacji form fizycznych i chemicznych pierwiastka oraz ich ilościowego oznaczenia w badanym obiekcie jest dużym wyzwaniem współczesnej analityki weterynaryjnej i środowiskowej. Badania specjacji są szczególnie wrażliwe na wszelkie operacje fizyczne, czy też chemiczne, którym poddawana jest próbka przed wykonaniem właściwego pomiaru. Jest to związane z niewielką stabilnością, a najczęściej brakiem równowagi chemicznej pomiędzy formami, w jakich występuje dany pierwiastek w badanym obiekcie. Pobieranie i przygotowanie próbki może wywoływać zaburzenie równowagi, dlatego też ten etap procedury jest niezmiernie ważny, aby oddać rzeczywisty stan badanej żywności. Wszystkie metody badania specjacji, w których konieczne jest przeprowadzenie podstawowych operacji fizycznych, czy też chemicznych obarczone są niepewnością wynikającą z labilnego stanu równowagi, często trudną do oszacowania. W celu wykonania analizy specjacyjnej najczęściej wykorzystywane są metody sprzężone, łączące

metody rozdziału poszczególnych składników obecnych w badanym materiale (najczęściej są to metody chromatograficzne i pokrewne) oraz odpowiednio czułe metody detekcji (np. spektrometria mas), pozwalające na oznaczenie danej formy chemicznej pierwiastka. Arsen jest jednym z pierwiastków o zróżnicowanej toksyczności, w zależności od formy specjacyjnej, w której występuje. Analityczna identyfikacja tych form, a także ocena toksykologiczna jest ważnym zagadnieniem, zarówno z poznawczego punktu widzenia, jak i oceny narażenia oraz ryzyka zdrowotnego konsumentów żywności zawierającej arsen. W tę tematykę badawczą wpisuje się recenzowana praca doktorska mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ z Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Praca doktorska mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ wykonana została pod kierownictwem prof. dr hab. Andrzeja POSYNIAKA oraz dr hab. Anny GAJDY, prof. instytutu. Dorobek naukowy i bogata wiedza promotorów sprawia, że są cenionymi i uznanymi autorytetami w analityce weterynaryjnej, a ich prace publikowane są w wysoko punktowanych czasopismach o międzynarodowej renomie i są licznie cytowane. Mgr inż. Agnieszka NAWROCKA prowadziła więc badania objęte tematem pracy doktorskiej pod opieką doświadczonych Promotorów, a także miała dostęp do dobrze zorganizowanego i wyposażonego warsztatu naukowego w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach. Pomiaru prowadzone były zgodnie z najwyższymi standardami metrologii chemicznej.

Według bazy *Web of Science* mgr inż. Agnieszka NAWROCKA jest współautorką 20 artykułów w czasopismach o obiegu międzynarodowym, w tym jednego artykułu dotyczącego tematyki objętej rozprawą doktorską, opublikowanego w prestiżowym czasopiśmie *Food Chemistry* (IF=8,8).

Dobór tematu, zakres i cel pracy

Badania, jakie podjęła Doktorantka, dotyczyły opracowania metody oznaczania całkowitej zawartości arsenu przy zastosowaniu spektrometrii mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (ICP – MS) oraz metody identyfikacji i oznaczania ilościowego poszczególnych form specjacyjnych arsenu w wybranych gatunkach ryb i owoców morza z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją w plazmie wzbudzonej indukcyjnie (HPLC – ICP – MS). Tak nakreślony cel badań wymagał opracowania metody ilościowego przeprowadzenia do roztworu arsenu zawartego w badanych materiałach biologicznych, optymalizacji podstawowych parametrów pomiarowych techniki ICP – MS oraz analizy specjacyjnej arsenu, obejmującej dobór warunków rozdzielania chromatograficznego

badanych form arsenu oraz sposobu przygotowania próbek, przy zastosowaniu techniki sprzężonej HPLC – ICP – MS. Jakość otrzymanych wyników badań zapewniono poprzez przeprowadzenie walidacji zaproponowanych procedur analitycznych oraz zastosowanie odpowiednich certyfikowanych materiałów odniesienia. Dodatkowo Autorka zweryfikowała poprawność zastosowanej metodologii poprzez swój udział w krajowych i międzynarodowych badaniach biegłości PT. W końcowym etapie badań Doktorantka dokonała oceny uzyskanych wyników badań w kontekście literatury światowej, przeprowadzając także ocenę narażenia konsumentów na toksyczne związki arsenu obecne w mięśniach wybranych gatunków ryb i owoców morza.

Chciałbym podkreślić, że tego typu badania są intensywnie prowadzone na świecie, a recenzowana praca doktorska stanowi ich istotny nurt. Uważam, że zakres zaplanowanych i przeprowadzonych w pracy badań pozwolił na realizację postanowionego celu, a tezy pracy zostały właściwie sformułowane.

Konstrukcja pracy

Praca liczy 153 strony, zawiera 24 tabele, 17 rysunków i 168 pozycji literaturowych. Dysertacja podzielona jest na 10 rozdziałów, pierwszy rozdział zatytułowany WPROWADZENIE ma charakter przeglądu literaturowego i jest poprzedzony wykazem stosowanych skrótów, rozdział drugi to CEL BADAŃ, pozostałe rozdziały dotyczą przeprowadzonych eksperymentów i w kolejności są to rozdziały zatytułowane: MATERIAŁ I METODY, PRZEBIEG I WYNIKI BADAŃ, DYSKUSJA, PODSUMOWANIE I WNIOSKI, STRESZCZENIE, ABSTRACT w języku angielskim, PIŚMIENNICTWO oraz ZAŁĄCZNIKI w formie przedruku stosowanych procedur badawczych, obejmujących 18 stron pracy. Cytowana w pracy literatura jest bardzo aktualna, ponad 70% cytowań to prace, które ukazały się po roku 2010, a jedynie 2,6% to prace z lat dziewięćdziesiątych. Wskazuje to, że temat pracy dotyczy współczesnych zagadnień. Zdziwienie budzi brak cytowania własnej pracy Autorki, opublikowanej w *Food Chemistry*, w roku 2022.

WPROWADZENIE to w pierwszej kolejności literaturowe kompendium wiedzy dotyczące biotransformacji w komórkach organizmów żywych nieorganicznych form arsenu do znacznie mniej toksycznych związków organicznych, m. in. do MMA, DMA, TMAO, AsB, AsC, arsenolipidów, czy też arsenocukrów. Autorka przedstawia również weterynaryjny wątek zastosowań organicznych związków arsenu, w tym szczególnie roksarsonu. Charakteryzuje uregulowania prawne dotyczące dopuszczalnych zanieczyszczeń żywności, pasz i mieszanek paszowych arsenem. Doktorantka przedstawiła także działania międzynarodowych instytucji zajmujących się oceną narażenia ludzi na pobranie arsenu wraz z żywnością. W dalszej kolejności,

w przeglądzie literaturowym, Autorka charakteryzuje metody analityczne stosowane w rozdziale i badaniu specjacji arsenu. W tym wiele uwagi poświęca technikom ekstrakcji związków arsenu z zastosowaniem metod ekstrakcji rozpuszczalnikowej, wspomaganej działaniem ultradźwięków, czy też energii mikrofalowej. Autorka wskazuje na szczególną użyteczność w badaniach specjacji chemicznej arsenu technik sprzężonych, w tym szczególnie HPLC – ICP – MS. W obszarze problemów analitycznych związanych z system detekcji sygnału arsenu zabrakło mi szerszej oceny interferencji występujących w technice ICP – MS i sposobów ich eliminacji, zwłaszcza korekcji matematycznej i zastosowań spektrometrów wysokiej rozdzielczości. Chciałbym dodać, że będę oczekiwał dyskusji na ten temat podczas obrony pracy doktorskiej. Bardzo sobie cenię obszernie porównanie literaturowe różnych technik stosowanych w analizie specjacyjnej arsenu, które Autorka zamieszcza w tabeli zbiorczej. Na zakończenie rozdziału literaturowego Doktorantka przedstawiła problem zanieczyszczenia organizmów wodnych arsenem oraz jego związkami, ze szczególnym uwzględnieniem ryb i owoców morza. Autorka zestawiała w zbiorczej tabeli aktualny stan badań dotyczący oceny zawartości arsenu całkowitego oraz jego form specjacyjnych w mięśniach wybranych gatunków skorupiaków, mięczaków i głowonogów, ryb morskich oraz ryb słodkowodnych. Na podstawie danych literaturowych Doktorantka wnioskuje, że zawartość arsenu całkowitego i jego związków w rybach, owocach morza i innych organizmach wodnych jest zróżnicowana i zależy przede wszystkim od gatunku oraz ich pochodzenia.

Część doświadczalna pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ, zawarta na str. 46 – 109, podzielona jest na 4 rozdziały. Jest ona bardziej obszerna w stosunku do części literaturowej. W części doświadczalnej Autorka zamieszczyła 18 tabel i 16 rysunków. Układ części doświadczalnej pracy jest typowy dla dysertacji w dziedzinie nauk weterynaryjnych. Część ta składa się z rozdziałów poświęconych kolejno: odczytnikom i stosowanej aparaturze, materiałom do badań, metodzie stosowanej do oznaczania arsenu całkowitego oraz analizie specjacyjnej arsenu w rybach i owocach.

Opracowanie metody oznaczania arsenu całkowitego w rybach i owocach morza realizowano poprzez: optymalizację warunków pomiarowych techniką ICP – MS, biorąc pod uwagę zminimalizowanie sygnałów tworzących się tlenków ($^{140}\text{Ce}^{16}\text{O}^+ / ^{140}\text{Ce}^+$) oraz jonów podwójnie naładowanych, przy jednocześnie niskich poziomach sygnału pochodzącego od tła, dobór wzorca wewnętrznego, którym ostatecznie był ^{103}Rh , optymalizację warunków mineralizacji ciśnieniowej materiałów biologicznych oraz walidację opracowanej procedury badawczej, obejmującą wyznaczenie parametrów LOD, LOQ, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, badanie odzysku oraz wyznaczenie niepewności rozszerzonej dla poziomu prawdopodobieństwa 95%. Zwaliowana metoda została zweryfikowana poprzez udział w międzynarodowych badaniach biegłości PT, organizowanych przez EURL ds. pierwiastków toksycznych w żywności

pochodzenia zwierzęcego i paszach (EURL – HM IRMM Geel, Belgia), a uzyskane wartości *z-score* mieściły się w zakresie akceptowanym. Autorka nie zamieszcza w raportach walidacyjnych zakresu walidacji i źródeł niepewności przy szacowaniu niepewności.

Badania nad opracowaniem metody rozdzielania i oznaczania wybranych form specjacyjnych arsenu, tj. AsB, AsC, As(III), As(V), DMA oraz MMA przeprowadzono przy użyciu techniki sprzężonej HPLC – ICP – MS. Optymalizacja warunków detekcji i rozdzielania chromatograficznego obejmowała: dobór kolumny analitycznej i ochronnej, skład, stężenie i proporcje poszczególnych składników fazy ruchomej, pH i prędkość przepływu fazy ruchomej, objętość dozowanej próbki, a także optymalizację programu i trybu elucji. W kolejnym etapie badań specjacyjnych arsenu opracowano i porównano sposoby postępowania z próbkami stałymi, poddany ekstrakcji wspomaganą ultradźwiękami lub mikrofalami, doboru składu mieszaniny ekstrakcyjnej, optymalizacji warunków ekstrakcji, wybierając ostatecznie technikę, zapewniającą wyizolowanie form specjacyjnych arsenu z materiałów biologicznych przy jednoczesnym zachowaniu jego pierwotnych form chemicznych w badanych materiałach. W ostatnim etapie badań specjacyjnych opracowaną procedurę analityczną oznaczania występujących form chemicznych arsenu w wybranych rybach i owocach morza poddano procesowi walidacji, na podstawie której wyznaczone zostały podstawowe parametry charakteryzujące metodę. Odnośnie sposobu szacowania niepewności wyników badań specjacyjnych arsenu Autorka zamieściła lakoniczną informację, że skorzystano z oprogramowania MUKIT (Measurement Uncertainty Kit), bazującego na podręczniku Nordtest 537 (Magnusson et al., 2017). Liczę, że podczas obrony pracy doktorskiej Doktorantka poda więcej szczegółów dotyczących szacowania niepewności w tym obszarze badań. Ważność uzyskanych wyników oznaczeń specjacyjnych arsenu opracowaną metodą Autorka potwierdziła poprzez uczestnictwo w różnych programach PT, dotyczących analizy związków arsenu. Jednocześnie, wyjaśniając, że ze względu na ograniczoną dostępność badań biegłości z zakresu analizy specjacyjnej arsenu w matrycach zbliżonych składem do ryb i owoców morza, ważność tych wyników została potwierdzona poprzez uczestnictwo w testach biegłości PT dla pasz zwierzęcych pochodzenia roślinnego.

W obszarze zastosowań praktycznych opracowanych procedur analitycznych Autorka zamieściła wyniki badań zawartości arsenu całkowitego oraz jego form specjacyjnych w 38 próbkach mięśni 20 gatunków ryb oraz w 70 próbkach mięśni ośmiu gatunków małż wraz ze szczegółowym komentarzem dotyczącym wzajemnej korelacji występujących form chemicznych arsenu. Wnioski zawarte w ocenie uzyskanych wyników w kontekście danych literaturowych uważam za trafne. W mojej ocenie w przyszłości możliwe jest ich ujęcie ilościowe po zastosowaniu odpowiednich technik chemometrycznych. Rozprawę kończy 12 stronicowy

rozdział zatytułowany DYSKUSJA, w którym to Autorka zebrała najważniejsze osiągnięcia badawcze, jakie uzyskała w ramach zakresu prac objętych dysertacją.

Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Generalnie praca doktorska napisana jest dobrym i komunikatywnym językiem, chociaż Autorka nie ustrzegła się sformułowań niepoprawnych. Przykładowo, wielokrotnie stosuje zamiennie słowa „stężenie” i „zawartość”, choć ich zakres znaczeniowy jest zupełnie inny, pierwsze odnosi się do roztworów, natomiast drugie do zawartości analitu w ciele stałym. W wielu tabelach podawane jest zbyt dużo cyfr znaczących dla prezentowanych wyników (np. Tab.:10, 14, 16), niepewność rozszerzona powinna zawierać dwie cyfry znaczące a nie zawsze ta reguła jest zachowana. Niepoprawne są sformułowania typu „analizowany pierwiastek” zamiast „oznaczany pierwiastek”, czy też „mineralizacja mikrofalowa” zamiast „mineralizacja wspomagana mikrofalami”, wyrażająca sposób dostarczania energii. Oczekiwałbym też podczas obrony pracy wyjaśnienia, w jaki sposób oceniono jednorodność badanych materiałów po procesie liofilizacji. Jest oczywiste, że większość powyższych uwag nie ma istotnego wpływu na ocenę wartości merytorycznej wyników pracy uzyskanych przez Doktorantkę. Ma natomiast wpływ na komfort Czytelnika, a także dostosowanie się do obowiązujących reguł metrologii chemicznej, szczególnie gdy wyniki badań mają charakter analityczny i są prezentowane także w obiegu międzynarodowym.

Wniosek

Stwierdzam, że praca doktorska mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ posiada wiele elementów nowości naukowej, szczególnie w zakresie opracowania nowych procedur analitycznych oznaczania arsenu całkowitego i jego form specjacyjnych w rybach i owocach morza techniką HPLC – ICP – MS, umożliwiającą identyfikację i jednoczesne oznaczenie ilościowe sześciu związków As (AsB, AsC, DMA, MMA, As (III) oraz As(V)) w próbkach ryb i owoców morza.


Część uzyskanych wyników badań mgr inż. Agnieszka NAWROCKA opublikowała we współautorstwie w artykule zamieszczonym w *Food Chemistry*, (IF= 8,8), co potwierdza wysoką wartość naukową uzyskanych wyników.

Przedstawiona w pracy metodyka badań nie budzi zastrzeżeń, a sposób prezentacji wyników jest jasny i czytelny, zaś ich interpretacja wskazuje na to, że mgr inż. Agnieszka NAWROCKA w oparciu o posiadaną wiedzę potrafi analizować kompetentnie i logicznie uzyskane wyniki. Występujące w pracy uchybienia edytorskie nie umniejszają wartości pracy. Podsumowując,

uważam, że przedłożona mi do recenzji praca doktorska mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ całkowicie spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65 poz. 595 z 14 marca 2003 r.). W związku z powyższym zwracam się do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach z wnioskiem o przyjęcie rozprawy i dopuszczenie mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę szeroki zakres badawczy rozprawy, aktualność tematyki, wysoką wartość naukową uzyskanych wyników oraz dorobek naukowy Pani mgr inż. Agnieszki NAWROCKIEJ z pełnym przekonaniem stawiam wniosek do Rady Naukowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach o wyróżnienie rozprawy.

Lublin, 2023-06-27

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Dobrowolski'.