



dr hab. inż. Mariusz Ślachciński
WYDZIAŁ TECHNOLOGII CHEMICZNEJ
Kierownik Zakładu Chemii Ogólnej i Analitycznej
ul. Berdychowo 4, 60-965 Poznań
tel.: tel. +48 61 665 2314, fax +48 61 665 2852
e-mail: Mariusz.Slachcinski@put.poznan.pl
www.fct.put.poznan.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej

Pani Magister Elwiry Koko

pt.

“Badanie pierwiastków toksycznych i fizjologicznych w ziołach.

Procedury analityczne, zależności, analiza specjacyjna ołowiu i kadmu”

Przedłożona do oceny dysertacja została wykonana przez Panią Magister Elwirę Koko na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, pod kierunkiem Pani Prof. dr hab. Danuty Barańkiewicz.

Podstawą do wydania opinii jest pismo Pana Dziekana Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu Prof. dr. hab. Macieja Kubickiego (L. dz WCH/390/KZ/2023).

Monitorowanie i oznaczanie zanieczyszczeń w próbkach środowiskowych i żywności ma kluczowe znaczenie ze względu na ich szkodliwy wpływ nie tylko na ludzi, ale także na ekosystemy. W przypadku zanieczyszczeń nieorganicznych procedury analityczne obejmują często jedynie określenie całkowitej zawartości pierwiastków. Jednakże, gdy toksyczność analitów silnie zależy od ich formy chemicznej, należy przeprowadzić również analizę specjacyjną. W związku z tym, opracowanie nowych metodyk i zastosowanie skutecznych technik analitycznych (również sprzężonych) w celu rozdzielenia i oznaczania pierwiastków

oraz ich form specjacyjnych, występujących często na poziomach śladowych, jest niezwykle istotne.

Pani Magister Elwira Koko podjęła się trudu opracowania nowych procedur analitycznych oznaczania całkowitej zawartości trzynastu pierwiastków w próbkach ziół oraz w ekstraktach ziółowych. Wykonała również analizę specjacyjną kadmu i ołowiu (Cd^{2+} , Pb^{2+} i $(\text{CH}_3)_3\text{Pb}^+$) z zastosowaniem techniki sprzężonej: wysokosprawna chromatografia cieczowa - spektrometria mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej z oktopolową komorą reakcyjną (HPLC/ICP-DRC-MS).

Recenzowana praca, przygotowana w formie monografii, posiada 206 stron maszynopisu, wraz z tabelami (38), rycinami (60) i spisem literatury. Na opracowanie literaturowe przeznaczono 68 stron. Koncepcja pracy jest ustawiona według następującego układu: 1) Wstęp; 2) Część literaturowa; 3) Cel pracy; 4) Część eksperymentalna, zawierająca omówienie wyników, podsumowanie wraz z wnioskami oraz spis cytowanej literatury. Uzupełnienie stanowi wykaz dorobku naukowego wraz z życiorysem Autorki rozprawy oraz lista stosowanych skrótów. Praca została zredagowana starannie, napisana poprawnym językiem i przystępnie. Przedstawia omawianą problematykę w odniesieniu do odpowiednio dobranego piśmiennictwa krajowego i zagranicznego; obejmuje szeroki zakres badań eksperymentalnych.

Autorka w części przeglądowej w kompetentny, wyczerpujący i interesujący sposób dokonała przeglądu literaturowego. Tę część pracy podzielono na kilka podrozdziałów, w których opisano źródła i znaczenie pierwiastków w żywności, rodzaje żywności, specjację, zanieczyszczenie środowiska, biotransformację pierwiastków toksycznych w organizmach żywych (wraz z ich wzajemnymi korelacjami), przeciwdziałanie zatruciom i ich leczenie oraz uregulowania prawne dotyczące pierwiastków toksycznych w żywności. W kolejnych rozdziałach Doktorantka skupiła się na omówieniu stosowanych procedur analitycznych. Na początek opisała etap przygotowania próbek do analizy, wymieniając systemy mineralizacji stosowane do rozkładu próbek żywności i dokonując ich charakterystyki. Następnie wymienione zostały techniki analitycznej spektrometrii atomowej (absorpcyjnej - AAS oraz optycznej emisyjnej - ICP OES), a także spektrometrii mas (ICP-MS) i neutronowej analizy aktywacyjnej (INAA), umożliwiające oznaczanie pierwiastków w materiale roślinnym. Kolejny rozdział poświęcono zagadnieniom związanym z analizą specjacyjną. Podkreślono znaczenie odpowiedniego przeprowadzenia próbki do roztworu, które nie doprowadzi do przekształcenia form pierwiastków obecnych w próbce w inne, zakłócając tym samym wyniki analizy. Następnie Autorka wskazała na konieczność stosowania technik sprzężonych

(łączonych), pozwalających na rozdzielenie oznaczanych składników, a następnie na ich detekcję. Opis uzupełniono Tabelą numer 15, prezentującą opracowane metodyki oznaczania kadmu i ołowiu w różnego rodzaju próbkach środowiskowych i żywności z uwzględnieniem sposobu przygotowania materiału badanego do analizy i zastosowanej techniki łączonej.

Przeprowadzoną analizę danych literaturowych oceniam bardzo wysoko. Autorka cytuje właściwe dane bibliograficzne, obejmujące aktualne i istotne pozycje związane z omawianą problematyką.

Część eksperymentalną poprzedza „*Cel pracy*”, w którym Autorka jasno sformułowała zakres prac którym było: oznaczenie całkowitej zawartości pierwiastków fizjologicznych, obojętnych i wywołujących efekty toksyczne w próbkach ziół pochodzenia chińskiego, a także oznaczenia trzech form specjacyjnych: Cd^{2+} , Pb^{2+} i $(CH_3)_3Pb^+$. Cel główny został poszerzony o badania zależności między pierwiastkami (działanie antagonistyczne lub synergistyczne) z zastosowaniem metod chemometrycznych.

Na kolejnych stronach Doktorantka przedstawiła spis stosowanej aparatury i odczynników. Materiał badawczy stanowiły, handlowo dostępne, mieszanki ziół, herbaty oraz części ziół: korzenie, kłącza, łodygi, owoce i liście. Próbki poddano mineralizacji na mokro w systemie zamkniętym z ogrzewaniem mikrofalowym w celu oznaczenia całkowitej zawartości trzynastu pierwiastków. Oznaczanie przeprowadzono w dwóch seriach za pomocą spektrometru mas z jonizacją w plazmie indukcyjnie sprzężonej wyposażanego w oktopolową komorę reakcyjną (ICP-ORS-MS) w trybie standardowym (Se i Cd) oraz helowym (Pb, Ba, Sr, As, Cu, Zn, Ni, Co, Mn, V i Mg).

Próbki korzeni poddano procedurze ekstrakcji w wodzie demineralizowanej w celu przeprowadzenia analizy specjacyjnej w przesączu oraz do określenia całkowitej zawartości pierwiastków (przesącz z dodatkiem kwasu azotowego V). Kalibrację przeprowadzono metodą krzywej wzorcowej, a dodatkowo wprowadzono roztwór rodu, pełniącego rolę wzorca wewnętrznego.

Przeprowadzono walidację zaproponowanej procedury analitycznej. W tym celu wyznaczono granice wykrywalności i oznaczalności, zakres roboczy, precyzję i poprawność. Spójność pomiarową zapewniono, stosując trzy, odpowiednio dopasowane pod względem matrycy, certyfikowane materiały odniesienia o najwyższej jakości metrologicznej: mieszanka ziół polskich (*Mixed Polish Herbs*, INCT-MPH-2), liście jabłoni (*Apple Leaves*, 1515 NIST, USA) oraz liście szpinaku (*Spinach Leaves*, 1570A NIST, USA).

Z powodzeniem oznaczono całkowitą zawartość pierwiastków w materiale roślinnym. Anality podzielono na trzy grupy: mające działanie toksyczne nawet w niewielkich ilościach (As, Cd,

Pb i Ni), pierwiastki korzystne fizjologicznie (Mg, V, Mn, Co, Cu, Zn i Se), aktywujące procesy metaboliczne, ale również w wysokich ilościach mogące być szkodliwe zarówno dla człowieka, jak i roślin, oraz pierwiastki obojętne (Sr, Ba), które są nieszkodliwe lub słabo toksyczne.

Wykazano wysoki poziom zawartości arsenu i kadmu - w 30% próbek była wyższa niż 0,25 mg kg⁻¹ As, a w przypadku kadmu w 20% próbek przekraczała wartość 0,25 mg kg⁻¹.

Wysoką ilość niklu zauważono w próbkach herbat (zielonej i czerwonej), natomiast w żadnej próbce nie przekroczona została dopuszczalna maksymalna zawartość ołowiu (10 mg kg⁻¹s.m. wg WHO).

Następnie przeprowadzono analizę pierwiastkową w próbkach korzeni (dwie partie zakupione w 2020 i 2021 roku), ze szczególnym uwzględnieniem składników toksycznych, kumulujących się w tej części rośliny. Uzyskane wyniki mieszczą się w zakresach podanych w danych literaturowych.

Autorka przeprowadziła również badania wzajemnej zależności oznaczanych składników w ziołach, mieszankach ziół, herbatach oraz korzeniach ziół. Zastosowanie metod statystycznych (analiza zmiennych kanonicznych i efektów interakcji, analiza regresji wielokrotnej) pozwoliła na wskazanie korelacji między pierwiastkami (działanie synergistyczne bądź antagonistyczne) z uwzględnieniem partii próbek. Wykazano istotne zależności między pierwiastkami we wszystkich korzeniach: Mg z Sr; V z Pb, As i Ba; Mn z Pb; Fe z As i Ba; Co z Ni i Sr, Cu z Pb, Cd i As; Zn z Pb, Cd, As i Ba.

W kolejnym etapie prac wykonano analizę specjacyjną kadmu i ołowiu (Cd²⁺, Pb²⁺ i (CH₃)₃Pb⁺) w dziesięciu próbkach korzeni ziół, w których uprzednio określono całkowitą zawartość analitów. W tym celu przeprowadzono ekstrakcję w warunkach typowych dla przygotowania naparów ziołowych przez konsumentów (woda podgrzana do temp 100°C). Przed przystąpieniem do pomiarów zoptymalizowano szereg parametrów wpływających na pracę spektrometru mas (położenie palnika plazmowego, moc wyładowania, przepływ gazu nośnego/plazmowego (argon) oraz reakcyjnego w komorze DRC (tlen), napięcie na soczewkach ogniskujących jony, napięcie prądu stałego kwadrupola w komorze reakcyjnej), a także na jakość rozdziału chromatograficznego: dobór kolumny i składu fazy ruchomej (rodzaj eluenta, pH, szybkość przepływu).

Przeprowadzono walidację opracowanej procedury analitycznej z zastosowaniem techniki łączonej HPLC-ICP-DRC-MS. W tym celu oszacowano rozdzielczość sygnałów chromatograficznych, liniowość krzywych kalibracyjnych, granice wykrywalności i oznaczalności, precyzję i odzysku dodanych analitów.

Zastosowanie fazy ruchomej (pH 4,4) o składzie 40 mmol L⁻¹ EDTA, 20 mmol L⁻¹ TMAH, 10 mmol L⁻¹ kwasu szczawiowego pozwoliło na rozdzielenie oznaczanych składników w jednym cyklu pomiarowym, w krótkim czasie (poniżej 2 minut), z dobrą czułością i przy niskim zużyciu odczynników.

Opracowaną i zwalidowaną metodykę zastosowano do oznaczania form specjacyjnych kadmu i ołowiu. We wszystkich badanych próbkach uzyskano jedynie sygnały analityczne pochodzące od Cd²⁺ (zawartości w zakresie 3,3±0,7 - 108±9 µg kg⁻¹ s.m.) i Pb²⁺ (zawartości w zakresie 5,1±1,1 - 23,4±1,9 µg kg⁻¹ s.m.), a nie stwierdzono obecności (CH₃)₃Pb⁺. Średnie udziały zawartości oznaczonych form specjacyjnych wyniosły 59% dla kadmu i 59% dla ołowiu.

Metodyka badań przedstawiona przez Autorkę nie budzi moich zastrzeżeń. Opracowanie procedur analitycznych było przeprowadzone konsekwentnie, logicznie i w pełni zgodne z zasadami dobrej praktyki laboratoryjnej. Rezultaty prac przedstawione są w sposób czytelny, wskazując na bardzo dobrą znajomość omawianej tematyki i umiejętność stosowania metod statystycznych.

Wyniki prezentowane w kolejnych rozdziałach części eksperymentalnej, w postaci szeregu tabel i wykresów, zostały za każdym razem wnikliwie omówione i skonfrontowane z dostępnymi danymi literaturowymi. Pani Magister nie ograniczyła się jedynie do opracowania procedur analitycznych i zastosowania odpowiedniego instrumentarium analitycznego (w tym techniki łączonej), co już stanowi duże wyzwanie, ale także opisała źródła pierwiastków toksycznych w badanym materiale, możliwość i miejsca ich kumulacji, a także sposób wchłaniania w organizmie ludzkim.

Do obowiązków recenzenta należy również odnalezienie w pracy niedokładności, błędnych czy dyskusyjnych sformułowań oraz błędów literowych. Praca została zredagowana starannie i poza nielicznymi drobnymi błędami edytorskimi, które nie wpływają na odbiór pracy, nie zauważyłem większych uchybień.

Mam jednak kilka uwag, pytań oraz wątpliwości, które przedstawiam poniżej:

- w całej pracy, wielokrotnie pojawia się sformułowanie „*oznaczanie ilościowe*”;
- Autorka stosuje zapis skrótu techniki ICP-OES, sugerujący, że jest to technika łączona (sprzężona);
- w rozdziale „*Metody pozyskiwania składników aktywnych roślin*” przedstawiono procedury w sposób utrudniający zrozumienie, czy służą one do celów spożywczych czy laboratoryjnych (analitycznych);

- str. 157 Autorka pisze, że zastosowano „cyklonową komorę mgielną z koncentrycznym atomizerem”. Opisany układ nie służy do atomizacji (wytworzenia „wolnych” atomów), lecz do przekształcenia próbki ciekłej w aerozol;
- czy w procedurze przygotowania próbek, opisanej na str. 93, uzyskano całkowitą mineralizację materiału roślinnego? Nie podano wartości mocy promieniowania mikrofalowego;
- jaką metodę optymalizacji zastosowano do ustalenia parametrów wpływających na efektywność rozdziału chromatograficznego i pracę spektrometru?
- str. 173- nazwa techniki konwersji analitów „generacja wodorków” powinna być zastąpiona sformułowaniem „generowanie wodorków”. Jednak w przypadku oznaczania kadmu w formie gazowej, najtrafniejsza byłaby nazwa „chemiczne generowanie par”;
- jaka była rola w opracowanej metodyce dwóch certyfikowanych materiałów odniesienia: SLRS-6 *River Water* oraz TM-27.3 *fortified diluted lake Ontario water*?
- granice wykrywalności i oznaczalności umieszczone w tabelach można było dodatkowo wyrazić w przeliczeniu na masę, co ułatwiłoby odniesienie do wyników oznaczeń;
- jaki wpływ na wybraną szybkość przepływu fazy ruchomej ma konieczność zapewnienia efektywnej pracy rozpylacza (Tabela 18 oraz 35 i Rysunek 54)?
- nie przeprowadzono dyskusji dotyczącej wpływu zastosowanych odczynników, zwłaszcza w stosowanej technice sprzężonej na wartość sygnału analitycznego ślepej próbki;
- nie omówiono również efektów pamięciowych, które mogą odgrywać istotną rolę przy niskich przepływach roztworów (poniżej 1 mL min⁻¹);
- zapis wyników z różną liczbą cyfr znaczących, np. tabele nr 21 i 33;
- niekonsekwentny zapis jednostek: litr pisany wielką literą, a czasami małą, np. rysunek 59 oraz str. 181.

Powyższe uwagi w żadnym stopniu nie umniejszają wysokiego poziomu merytorycznego dysertacji, a jedynie mają stanowić przyczynek do dyskusji.

Pani Elwira Koko jest współautorką trzech prac naukowych, związanych tematycznie z problematyką podjętą w recenzowanej dysertacji, opublikowanych w czasopiśmie *Journal of Elementology* (w 2020 roku), *Scientific Reports* (w 2021 roku) i *Talanta Open* (w 2022 roku). Pełniła również rolę wykonawcy w projekcie Narodowego Centrum Nauki OPUS-13. Dorobek uzupełniają: wielokrotny udział w konferencjach krajowych i zagranicznych, ukończone szkolenia i kursy w kraju i zagranicą, odbyte staże oraz przyznane nagrody

(stypendium naukowe Rektora UAM, nagroda za prezentację konferencyjną i nagroda zespołowa przyznana przez Rektora UAM za osiągnięcia naukowe).

Podsumowując, mogę jednoznacznie stwierdzić, że efekty prac badawczych zaprezentowane w przedłożonej dysertacji, stanowią istotny wkład w rozwój chemii analitycznej poprzez opracowanie nowych metodyk z zastosowaniem nowoczesnego instrumentarium analitycznego (w tym technik sprzężonych). Należy także podkreślić, że wyznaczony cel pracy zastał w pełni zrealizowany.

Uważam, że rozprawa pt.: *“Badanie pierwiastków toksycznych i fizjologicznych w ziołach. Procedury analityczne, zależności, analiza specjacyjna ołowiu i kadmu”* przedstawiona przez Panią Mgr Elwirę Koko spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim określone w Ustawie z 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Stanowi bowiem, oryginalne rozwiązanie zagadnienia naukowego oraz wykazuje niezbędną ogólną wiedzę teoretyczną Autorki i umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym stwierdzam, że zasługuje w pełni na dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę poziom skomplikowania podjętego problemu analitycznego, szeroki zakres prac doświadczalnych i obliczeniowych wykonanych przez Doktorantkę, uzyskane wyniki oraz fakt iż zostały już opublikowane, chciałbym wystąpić z wnioskiem o wyróżnienie recenzowanej pracy.

Poznań, 6 grudnia 2023 roku

