

Kraków, 1 sierpnia 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Agaty Walkowiak-Bródki

zatytułowanej

Zastosowanie dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej w zakresie UV-VIS-IR i metod chemometrycznych w analizie produktów leczniczych i spożywczych

**i wykonanej pod kierunkiem dr hab. Bogumiły Kupcewicz, prof. UMK
na Wydziale Farmaceutycznym Collegium Medicum w Bydgoszczy Uniwersytetu
Mikołaja Kopernika w Toruniu**

Ocena podjętej tematyki badawczej

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska została zrealizowana w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej kierowanej przez Panią Prof. Bogumiłę Kupcewicz, która od wielu lat zajmuje opracowaniem nowatorskich metod spektroskopowych i chromatograficznych do profilowania zanieczyszczeń preparatów leczniczych i suplementów diety przy użyciu wielowymiarowej analizy danych. Ich opracowanie jest nadal bardzo pożądane, zwłaszcza w kontekście wykrywania zafalszowań tego typu produktów, bezpieczeństwa zdrowia konsumentów i wymuszenia na producentach stosowania norm zapewniających jakość produktu. Pomimo dyrektywy Unii Europejskiej o kontroli i obrocie suplementów żywnościowych, system nadzoru nad wprowadzaniem takich produktów na rynek nadal nie zapewnia konsumentowi bezpieczeństwa zdrowotnego. Weryfikacja jakości nowego suplementu przez GIS w Polsce jest wybiórcza i czasochłonna a przede wszystkim ograniczona dostępnymi narzędziami analitycznymi, które mogłyby posłużyć jako szybki sposób przesiewowy. Prym wiodą techniki chromatograficzne i spektrometrii mas. Metody oparte na detekcji spektroskopowej (oscylacyjnej i elektronowej) są już uznanymi podejściami do identyfikacji zafalszowań leków, suplementów oraz żywności na świecie (np. Niemczech, USA czy Japonii). Niestety praktyczne stosowanie metod spektroskopowych w Polsce jest mało popularne pomimo ich wielu zalet jak dostęp do prostych w obsłudze i przenośnych aparatów, brak wysokich wymagań w przygotowaniu próbki oraz możliwość utworzenia algorytmu maszyny uczącej do analizy widma. Jak sam pomiar widma jest wręcz banalny, to jego analiza wymaga już zaawansowanych i wielowymiarowych metod

skondensowanych w zweryfikowany protokół. W ten obszar analizy produktu leczniczego i suplementów oraz wykrywania ich zafalszowań wpisuje się praca doktorska mgr Agaty Walkowiak-Bródki, co stawia ją w szeregu prac naukowych o wysokim stopniu zapotrzebowania. Jej innowacyjnym aspektem było zastosowanie dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej, ze szczególnym uwzględnieniem jej dwuśladowej metody do określenia składu leków i suplementów roślinnych zawierających wyciągi z liści miłorzębu japońskiego (*Ginkgo biloba* L.) i morwy białej (*Morus alba* L.). Wybór tematyki badawczej jest zatem w pełni uzasadniony oraz bardzo istotny z naukowego, poznawczego i w konsekwencji praktycznego punktu widzenia nauk farmaceutycznych.

Ocena formalna dysertacji

Praca doktorska Pani Agaty Walkowiak-Bródki ma formę opracowanego intrologatorsko opracowania będącego kompilacją klasycznej rozprawy doktorskiej i spójnego tematycznie cyklu czterech publikacji. Cykl ten uwzględnia dwie prace przeglądowe przedstawiające analizę chemiczną produktów roślinnych oraz działanie przeciwcukrzycowe morwy białej. Oba są opublikowane w czasopiśmie *Farmacja Polska* uznanym przez Ministerstwo Nauki i Edukacji (pkt. MNiE: 70). Pozostałe publikacje dotyczą *stricte* meritum prac eksperymentalnych Doktorantki i przedstawiają wyniki analizy korelacyjnej widm UV-Vis i ATR FTIR produktów leczniczych i suplementów zawierających wyciągi z liści miłorzębu japońskiego. Artykuły te zostały opublikowane w rozpoznanych na arenie międzynarodowej czasopismach z tzw. listy filadelfijskiej, tj. *Molecules* i *Spectrochimica Acta Part A* o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 9,7$. Spelnione są zatem wymagania formalne i zwyczajowe, aby wyniki pracy doktorskiej były rozpowszechnione wśród społeczności naukowej. Oświadczenia współautorów oraz pierwsze autorstwo mgr Agaty Walkowiak-Bródki jednoznacznie świadczą o Jej istotnym wkładzie w powstanie tychże publikacji. Doktorantka wykonała prace eksperymentalne, opracowała większość analiz i współpracowała przy przygotowaniu manuskryptów i ich redakcji. Zasadnicza część pracy doktorskiej mieści się na ok. 100 stronach i ma ona typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich z podziałem na Wstęp Teoretyczny, Cele Pracy, Materiał i Metody, Wyniki i Dyskusja, Podsumowanie i Wnioski, Bibliografie, Streszczenie (w języku polskim i angielskim) oraz wspomniany cykl publikacji. Rysunki i tabele obrazują większość uzyskanych wyników. Struktura pracy nie budzi wątpliwości. Rozprawa odnosi się do 135 odnośników literaturowych, w dużej większości to artykuły opublikowane w renomowanych międzynarodowych czasopismach. Autorka używa ich we wstępie teoretycznym do przedstawienia aktualnego stanu wiedzy jak i w dyskusji porównując otrzymane wyniki z innymi pracami. Są to najnowsze doniesienia naukowe, odpowiednio dobrane do tematyki omawianej w pracy. Świadczy to zarówno o dużym nakładzie pracy Autorki jak i szerokim rozpoznaniu aktualnej wiedzy naukowej. Rozprawa doktorska jest napisana w zwięzłym i syntetycznym stylu oraz wykazuje nie tylko wysoką jakość naukową, ale też posiada walory praktyczne.

Ocena merytoryczna dysertacji

Po krótkim wstępie opisującym znaczenie metod spektroskopowych w analizie produktów leczniczych i spożywczych oraz zasadę spektroskopii korelacyjnej i chemometrii, Autorka dysertacji

poprawnie definiuje cel badawczy. A jest nim wykorzystanie dwuśladowej dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej (2T2D-COS), zaproponowanej przez wybitnego spektroskopistę prof. Isao Node, do kontroli jakości leków i suplementów zawierających substancje lecznicze liści miorzębu japońskiego i morwy białej. Cel ten Pani mgr A. Walkowiak-Bródka zrealizowała poprzez poprawnie zaprojektowane sześć etapów pracy doświadczalnej. Są nimi: 1) analiza składu wybranych produktów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (metoda referencyjna), 2) zarejestrowanie bazy danych spektralnych w postaci widm absorpcyjnych w zakresie światła UV-Vis i MIR, 3) modelowanie zawartości związków aktywnych lub klasyfikacji produktów w oparciu o jednowymiarowe widma i algorytm cząstkowych najmniejszych kwadratów (PLS), 4) określenie informacji chemicznej, tj. sygnałów daktyloskopowych badanych produktów poprzez obliczenie dwuwymiarowych widm produktów i widm referencyjnych czystych składników lub standaryzowanych produktów, 5) wskazanie zakresów w widmach 2T2D użytecznych dla określenia jakości produktów leczniczych i suplementów oraz 6) przeprowadzenie analizy głównych składników (PCA) z wykorzystaniem asynchronicznych widm dwuwymiarowych. Dobór metod i badanych produktów został przeprowadzony w prawidłowy sposób. Badany materiał uwzględniał leki i suplementy diety oraz suszony materiał roślinny w różnej postaci. Zapewniło to różnorodność produktów i wyeliminowało wpływ postaci produktu roślinnego na analizę. Źródła badanych produktów również były zdywersyfikowane. Do modeli kalibracyjnych i walidacji krzyżowej posłużono się sygnaturą spektroskopową głównych składników bioaktywnych miorzębu japońskiego i morwy białej jak na przykład rutyną, kwercetyną, kwasem chlorogenowym czy 1-deoksynojirimycyną.

Najbardziej obszerna część dysertacji stanowi opis otrzymanych wyników i ich interpretacji. Zasadniczo jest podzielona na dwie części, w których Autorka przedstawia analizę chromatograficzną, korelacyjną i chemometryczną produktów z wyciągiem miorzębu i osobno morwy białej. Ciekawym rezultatem jest określenie składu leków i suplementów diety dla miorzębu japońskiego. Doktorantka wskazała po pierwsze wpływ sposobu ekstrakcji na otrzymaną detekcję bioaktywnych substancji, co wskazuje na konieczność opracowania odpowiedniej metody. Ale też jednoznacznie udowodniła, że większość suplementów, pomimo deklarowanego użycia wyciągu z miorzębu japońskiego, była zafalszowana dodatkiem aglikoli lub mieszaniami z innymi roślinami leczniczymi. Ważną obserwacją jest także brak podobieństwa składu pomiędzy suplementami zawierającymi ekstrakt z liści i suszone liście morwy białej. Bazując na tak określonym składzie mgr Agata Walkowiak-Bródka ten sam zestaw produktów analizowała technikami spektrofotometrii (tylko w przypadku produktów z miorzębu japońskiego) i spektroskopii IR, tj. techniką osłabionego wewnętrznego odbicia z transformatą Fouriera (ATR FTIR). Metoda iPLS DA została zastosowana z satysfakcjonującą dokładnością do identyfikacji suplementów diety z nadmiarową zawartością rutyny, kwercetyny i kemferolu w produktach z miorzębu japońskiego oraz wyznaczenia zależności pomiędzy stężeniem 1-deoksynojirimycyna (DNJ) a intensywnością sygnału w jednowymiarowych widmach ATR FTIR. Autorka zaproponowała tu kilka modeli i określiła ich skuteczność wskazując jakie składniki lub ich mieszanina klasyfikuje jakość produktu żywnościowego

poprzez jego skład oraz wykazała wysoki potencjał predykcji stężenia DNJ. W mojej opinii otrzymany poziom dokładności jest wystarczający dla dalszego zaprojektowania metody przesiewowej.

Dwuśladową dwuwymiarową spektroskopię korelacyjną zastosowano do widm UV-Vis ekstraktów alkoholowo-wodnych i wodnych badanych produktów z miłorzębu japońskiego oraz widm ATR FTIR produktów miłorzębu i morwy białej. Zadania, których się podjęła Autorka są bardzo wymagające pod kątem interpretacji i jego wyniki z pewnością mogą posłużyć dalszym pracom nad tym zagadnieniem. Autorka poddaje tej analizie widma suplementów wybierając różne formy referencji, co jest też poprawnym zabiegiem, ponieważ jego skład będzie decydował o postaci mapy asynchronicznej. Dodatkowym zabiegiem było sprzężenie tych ostatnich z analizą głównych składowych. To podejście jest bardzo ciekawe i oryginalne. Niewątpliwie liczba i znak pików krzyżowych dostarcza wiele dodatkowych cech zbiorów danych umożliwiając tym samym ich segregację według właściwości spektralnych a więc chemicznych. Zaletą takiej metodologii jest jej niezależność od artefaktów widma typowych w przypadku analizy nienadzorowanej widm jednowymiarowych. Doktorantka udowadnia skuteczność tej metodologii odnosząc się do składu wyznaczonego w analizie chromatograficznej.

Do najważniejszych osiągnięć przedstawionych w pracy doktorskiej Pani mgr Agaty Walkowiak-Bródki zaliczam:

- podanie protokołu analizy 2T2D-COS, MPCA i PLS widm elektronowych ekstraktów badanych produktów i widm ATR FTIR zarejestrowanych *in situ*, który w mojej ocenie może być z łatwością uogólniony do oceny jakości innych leczniczych produktów roślinnych,
- wskazanie jakie cechy analizy 2T2D-COS i chemometrycznej są istotne dla rozpoznania zafalszowań suplementów zawierających wyciąg z miłorzębu japońskiego i morwy białej,
- weryfikację zaproponowanej metodologii w odniesieniu do wyników rutynowo wykonywanej analizy chromatograficznej.

Lektura rozprawy zachęca do stawiania kolejnych pytań na zasadzie dyskusji naukowej. Chciałabym poznać stanowisko Doktorantki w następujących kwestiach.:

- Interpretacja asynchronicznych widm ATR FTIR jest sporym wyzwaniem dla próbek o różnym i właściwie nieprzewidywalnym składzie jak w zafalszowanych suplementach diety. Czy jest ona konieczna dla kontroli jakości produktu? I czy mogą być podstawą modelu dyskryminującego typu PLS DA?
- Jak sama Autorka podkreśla rutynowo stosuje się analizę chemometryczną dla jednowymiarowych widm i stąd proponuje podejście 2T2D-COS. Czy podsumowując wyniki swoich badań jest możliwe stwierdzenie, że to podejście ulepsza klasyfikację produktów roślinnych i czy należałoby wprowadzić je na stałe do ich kontroli? Jest taka teza postawiona w pkt. 3 i 4 Wniosków, ale nie znalazłam jasno wyrażonych dowodów na jej potwierdzenie.
- Jaka jest opinia Autorki badań na temat korelacji widm UV-Vis i ATR FTIR i zastosowania ich widm asynchronicznych do MPCA, aby zaobserwować grupowanie suplementów?

- Jaki protokół analizy suplementów diety można zaproponować na podstawie tych badań biorąc pod uwagę potrzebę automatyzacji takiej metodologii tak aby mógł ją wykonać np. pracownik instytucji kontrolującej rynek suplementów?

Uwagi i sugestie

Rozprawa zawiera także pewne mankamenty, których waga nie jest duża, lecz z obowiązku recenzenta należy je wymienić:

- 1) Dla spójności otrzymanych wyników, spodziewano by się, że taki sam zestaw metod będzie zastosowany dla produktów z miłorzębu japońskiego i morwy białej. Proszę komentarz dlaczego nie zastosowano spektroskopii UV-Vis dla produktów z morwy białej.
- 2) Zastosowano różne widma referencyjne dla obliczenia map asynchronicznych i grupowania obiektów w analizie MPCA, ale brakuje spinającego te wyniki wniosku czy poprawne grupowanie produktów roślinnych i suplementów (wg. analizy chromatograficznej) jest zależne od referencji a jeśli tak, to czy można zaproponować modelową próbkę referencyjną.

Autorka nie uniknęła również pewnych błędów edycyjnych:

- 3) Rys. 18, 20, 31, 32: brak legendy kolorów dodatnich i ujemnych pików krzyżowych.
- 4) Rys. 30: brak jednostek stężenia; najwyższe stężenie DNJ wynosi 2 i nie odpowiada najwyższej wartości substancji 5E (ok. 1,4 mg/g).
- 5) Używane są różne nazwy (średnia, podstawowa) dla zakresu MIR światła (ang. mid infrared). Osobiście jestem zwolenniczką stosowania nazwy środkowa podczerwień (i takie znaczenie ma w innych językach), ponieważ jest to zakres leżący pomiędzy daleką i bliską podczerwienią i nie jest średnią jakiś wartości. Używane są również różne skróty, FT-MIR, FTIR-MIR, FTIR (np. Tabela 1). W pracy jest sporo spolszczonych zapożyczeń z języka angielskiego (adulterowane produkty, fingerprint), których można było uniknąć.

Nie są to jednak błędy liczne i dlatego uważam pracę za napisaną bardzo starannie zarówno pod kątem stylistycznym jak i graficznym. Jakość rysunków jest bardzo dobra, przygotowane zostały w spójny sposób ułatwiający ocenę uzyskanych wyników.

Podsumowanie

Pomimo wymienionych zastrzeżeń, których większość ma charakter całkowicie dyskusyjny, uważam, że Pani mgr Agata Walkowiak-Bródka przygotowała ciekawą i aktualną pracę doktorską na dobrym poziomie. Uważam, że rozprawa wnosi nową wiedzę na temat możliwości zastosowania klasycznej spektroskopii molekularnej do detekcji zafalszowań produktów leczniczych i spożywczych, ale przy zastosowaniu nowatorskiej metody korelacyjnej sprzężonej z wielowymiarową analizą chemometryczną. Podjęty temat nie był łatwy i wymagał systematycznych pomiarów, analiz oraz doboru odpowiednich obiektów. Należy również podkreślić, zaangażowanie Doktorantki w zdobycie środków na finansowanie swoich badań, Jej aktywność w rozpowszechnianiu wyników na konferencjach krajowych

i międzynarodowych, która była kilkakrotnie nagradzana oraz aktywność w towarzystwach naukowych. Jest również współautorką dwóch dodatkowych artykułów naukowych. Życiorys naukowy świadczy o doskonałym przygotowaniu Pani Magister do pracy naukowej.

Reasumując, stwierdzam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Agaty Walkowiak-Bródki pt. *Zastosowanie dwuwymiarowej spektroskopii korelacyjnej w zakresie UV-VIS-IR i metod chemometrycznych w analizie produktów leczniczych i spożywczych* **stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim**, określone w art. 14 ust. 1 z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2017 r. oraz art. 179 ustawy z dnia 3 lipca 2018 r.) oraz przepisach wprowadzające ustawę – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 30 sierpnia 2018 r. poz. 1669). Poziomi naukowy jest wysoki a udział Autorki w realizację zaprezentowanych wyników badań jest znaczący. Przedstawione do recenzji opracowanie wraz z zestawem publikacji nie pozostawiają wątpliwości co do wysokich umiejętności i samodzielności Doktorantki w realizacji prac naukowych oraz redagowaniu publikacji naukowych na odpowiednio wysokim poziomie. **Wnioskuje zatem do Rady Dyscypliny Nauki Farmaceutyczne Collegium Medicum w Bydgoszczy UMK o dopuszczenie Doktorantki do dalszym etapów przewodu doktorskiego.**

