

prof. dr hab. Wojciech Marczak

4.01.2022 r.

Uniwersytet Humanistyczno-Przyrodniczy im. Jana Długosza

Wydział Nauk Ścisłych, Przyrodniczych i Technicznych

al. Armii Krajowej 13/15

42-200 Częstochowa

Ocena rozprawy pani magister Patrycji Marczewskiej

pt. „Kontrola jakości środków ochrony roślin z wykorzystaniem technik chromatograficznych i elementów modelowania chemometrycznego”,

wykonanej w Laboratorium Badania Jakości Środków Ochrony Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego Oddział Sośnicowice pod kierunkiem dr. hab. Mieczysława Sajewicza, prof. UŚl,

złożonej w Uniwersytecie Śląskim w związku z ubieganiem się o stopień naukowy doktora

Środki ochrony roślin są przedmiotem regulacji prawnych na poziomie Unii Europejskiej i krajowym. Przyczyną tego jest dążenie do zapewnienia właściwego działania tych środków, będących substancjami lub preparatami oraz organizmami żywymi, w zakresie ochrony roślin uprawnych przed organizmami szkodliwymi oraz regulowania procesów biologicznych w tych roślinach. W konsekwencji, dopuszczenie środka ochrony roślin do stosowania w rolnictwie wymaga jego rejestracji. Zarejestrowane środki wykazują skuteczność biologiczną i niską szkodliwość dla ludzi i zwierząt stałocieplnych w danych warunkach klimatycznych. Jakość środków ochrony roślin stosowanych w Polsce jest zgodnie z obowiązującymi przepisami kontrolowana przez Laboratorium Badania Jakości Środków Ochrony Roślin Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego, w którym zatrudniona jest autorka rozprawy. W tym kontekście ważnym problemem jest opracowanie wiarygodnych i relatywnie prostych metod analiz chemicznych oraz identyfikowania środków ochrony roślin. Takim zadaniem zajęła się mgr Marczevska.

Pierwszym celem pracy było opracowanie i scharakteryzowanie metody jednoczesnego oznaczania azoksystrobiny (izomeru E) jako substancji czynnej oraz Z-azoksystrobiny i toluenu jako zanieczyszczeń w środkach ochrony roślin. Po drugie, autorka zajęła się metodą jednoczesnego oznaczania azoksystrobiny oraz siedmiu substancji czynnych występujących obok niej w środkach ochrony roślin: chlorotalonilu, cyprokonazolu, difenokonazolu, epoksykonazolu, izopirazamu, propikonazolu i tebukonazolu.

Mgr Marczevska opracowała i przetestowała metodę wykorzystującą wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), która okazała się odpowiednia do założonych celów. Wprawdzie nie udało się zaproponować procedury pozwalającej na oznaczenie azoksystrobiny, Z-azoksystrobiny i toluenu w jednym toku analitycznym, ale uzyskany rezultat – dwie procedury realizowane z zastosowaniem tej samej kolumny chromatograficznej: jedna dla obu izomerów azoksystrobiny, a druga dla toluenu – okazał się sukcesem, co potwierdzono staranną walidacją. Z kolei wyniki analiz próbek złożonych dowodzą, że metoda nadaje się do jednoczesnego oznaczania stężeń wspomnianych substancji czynnych w preparatach z azoksystrobina. To jej istotna zaleta. Autorka zwraca uwagę, że dotychczas nie wykorzystywano HPLC w takich oznaczeniach, o czym świadczy brak doniesień literaturowych.

Obok środków dopuszczonych do obrotu, przedmiotem handlu są środki niezarejestrowane, co stanowi naruszenie prawa. Ponadto, środki niezarejestrowane mogą być nieskuteczne lub zagrażać zdrowiu ludzi i zwierząt oraz środowisku. Oczywiście nie można nie wspomnieć tu o kwestii ekonomicznej – firmy ponoszące koszty badań i wdrożeń są pozbawiane zysków przez korzystających z ich dorobku nieuczciwych producentów. Kolejnym celem pracy było zatem znalezienie sposobu rozróżniania środków zarejestrowanych od ich niezarejestrowanych odpowiedników. Jest to trudne zadanie i, jak można przypuszczać, nie zawsze wykonalne, zwłaszcza jeśli wyrób nieoryginalny jest dobrej jakości. W porównaniach oryginalnych i nieoryginalnych środków ochrony roślin autorka wykorzystwała informacje obejmujące zawartości w nich substancji czynnej, oznaczone opisaną metodą, oraz sześć parametrów fizykochemicznych: gęstość, trwałość zawiesiny, pH fazy wodnej, pozostałość na sicie mokrym, kolor oraz zawartość wody. Zastosowała szereg metod chemometrycznych prowadzących do przyporządkowania analizowanych próbek do dwóch zdefiniowanych wcześniej klas: preparatów oryginalnych i nieoryginalnych. Zadanie to zakończyło się częściowym sukcesem.

Praca mgr Marczewskiej obejmuje zatem dwie grupy zagadnień. Pierwszą, którą można nazwać eksperymentalną, związaną z wyznaczaniem parametrów chemicznych i fizycznych, i drugą, chemometryczną, której istotą jest uzyskanie informacji ze zgromadzonych danych eksperymentalnych.

Przedstawione wyniki oznaczeń chromatograficznych są znakomitej jakości. Specyficzność, dokładność, precyzja i liniowość metody zostały zbadane wzorowo. Opis metody jest jasny, pozwala na odtworzenie postępowania w innym laboratorium. Nie mam tu żadnych uwag krytycznych. Co do wyznaczonych parametrów fizykochemicznych, zebranych w Tabeli 14 (str. 70) mam nieco wątpliwości, które wymienię poniżej.

1. Trwałość zawiesiny

Wszystkie wartości trwałości zawiesiny przekraczają 100%, niekiedy sięgają nawet 106%. Nie rozumiem takich wyników. W opisie metody badania trwałości zawiesiny (str. 67, trzeci wiersz od góry) autorka pisze: „Po 30 minutach usunięto górne 225 ml (9/10 części) zawartości (...) nie poruszając osadu w cylindrze.” Skoro pojawił się osad, to znaczy, że zawiesina sedymentuje. Zatem należałoby oczekiwać że jej trwałość jest niższa niż 100%, bowiem zgodnie z równaniem 9 (str. 67), trwałość zawiesiny powinna zawierać się od 0% (brak sedymentacji) do 100% (gdy w zadanym czasie zaszła całkowita sedymentacja). Wynik powyżej 100% oznacza, że nie zachodzi sedymentacja, lecz faza rozproszona wykazuje tendencję do wypływania na powierzchnię fazy rozpraszającej. W takiej sytuacji należałoby się jednak spodziewać gęstości zawiesiny niższej niż gęstość czystej fazy rozpraszającej, a tak – przynajmniej biorąc pod uwagę gęstości podane w Tabeli 14 – nie jest. W pracy pozostawiono to bez komentarza. Ponadto dwa miejsca po przecinku w wartości trwałości zawiesiny świadczą o chyba zbyt optymistycznej ocenie niepewności pomiaru.

2. Gęstość

Gęstość mierzona była densytometrem oscylacyjnym, czyli jak autorka przyznaje, niezgodnie z zaleceniami Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC). Istotnie, niekiedy pomiar densytometrem oscylacyjnym stosuje się do zawiesin¹, ale nie wiem o systematycznych porównaniach wartości gęstości zawiesin wyznaczonych tradycyjnie, tj. metodą piknometryczną, i densytometrem oscylacyjnym. Autorka także nie wspomina o badaniach porównawczych, choć pisze że „... użycie automatycznego gęstościomierza

¹ np. J. Hermoso, F.J. Martinez-Boza, C. Gallegos, Organoclay influence on high pressure-high temperature volumetric properties of oil-based drilling fluids, *J. Petrol. Sci. Eng.* 151, 2017, 13-23

pozwoiliło na (...) uzyskanie stabilniejszych wyników...”. Nie podaje także trzech wyników dla kaźdej zawiesiny (o trzech pomiarach informuje na str. 68) ani rozstępu. *Nb.* stabilność wskazań miernika nie musi świadczyć o tym, że wynik jest poprawny. Istotny jest model matematyczny pozwalający na przeliczenie mierzonej wielkości fizycznej (tu częstotliwości) na wielkość nas interesującą (tu gęstość).

Warto pamiętać, że elementem pomiarowym w densytometrze oscylacyjnym jest U-rurka wypełniona badaną substancją, wprowadzana w drgania rezonansowe. Podstawowy wzór wiążący gęstość płynu z kwadratem częstotliwości drgań wynika z równania oscylatora harmonicznego. Jest on poprawny dla bryły sztywnej. Płyn lepki wypełniający U-rurkę nie jest taką bryłą, co wpływa na wyznaczoną częstotliwość drgań. Autorka jest tego świadoma, o czym świadczy równanie 11 na str. 68 pracy. W przypadku zawiesiny, w U-rurce przyrządu znajduje się układ dwufazowy, zatem trzeba by chyba uwzględniać jeszcze co najmniej dwa czynniki: ruch cząstek fazy rozproszonej względem rozpraszającej, obniżający częstotliwość drgań, oraz możliwą adsorpcję na powierzchni rurki. Trudno ocenić, czy te efekty byłyby w rozważanym przypadku istotne, ale przejście do porządku dziennego nad tym zagadnieniem nie jest rozsądne.

3. Kolor

Kolor próbek określano wg skali barw Munsella. Jediną cechą różnicującą był odcień, przyjmujący jedną z trzech wartości: 2,5, 5 albo 7,5 (Tabela 14). Jak przeprowadzono autoskalowanie tej wielkości? Zamiast ogólnie prawdziwego stwierdzenia: „Pominięcie etapu przygotowania danych może mieć negatywny wpływ na analizę danych” (str. 71, ostatnie zdanie w podrozdziale 4.4.2.) wolałbym konkretne informacje.

Mimo zastrzeżeń, przedstawiona w pracy analiza wyników metodami chemometrii budzi uznanie. W mojej ocenie trudno jednak oczekiwać pełnego sukcesu polegającego na opracowaniu metody pozwalającej na jednoznaczne zaklasyfikowanie danego środka ochrony roślin jako oryginalnego albo nieoryginalnego. Autorka zgodzi się chyba z tym poglądem, tym bardziej że o przyczynach takiego stanu rzeczy wspomina w rozdziale 5 „Wnioski”. Składniki preparatów, nawet wytwarzanych w tej samej fabryce, mogą pochodzić od różnych poddostawców. Nawet jeśli producentem danej substancji jest jedna firma, poszczególne partie produkcyjne mogą się od siebie różnić. A – jak można sądzić z przedstawionych w pracy wyników – produkty oryginalne i nieoryginalne są do siebie chyba podobne. Niestety, różnice trudno czytelnikowi dokładnie ocenić, bo zabrakło jasnej informacji które wyniki jakich próbek dotyczą.

Obowiązkiem recenzenta jest także ocena strony formalnej i edytorskiej pracy. Zasadnicza jej część liczy 104 strony, 29 rysunków i 21 tabel. Spis literatury obejmuje 153 pozycje. Trzy załączniki zawierają listę trzech artykułów, których mgr Marczevska jest współautorką, listę komunikatów konferencyjnych oraz życiorys. Kopie dwóch artykułów z *Journal of Environmental Science and Health* dołączono. Zawierają one część materiału z dysertacji.

Główną część pracy podzielono na 5 rozdziałów, z których trzy pierwsze tworzą wstęp teoretyczny, czwarty jest częścią doświadczalną i obliczeniową, a piąty stanowi podsumowanie i wnioski. Kolejne numerowane rozdziały to „Spis rysunków i tabel”, „Literatura” i „Załączniki”. Patrząc na spis treści można sądzić, że struktura jest typowa dla tego rodzaju prac. W rzeczywistości spora część materiału kwalifikującego się do wstępu teoretycznego została umieszczona w części doświadczalnej. Np. w zasadzie cały podrozdział 4.3.2 „Zastosowana metodyka” zawiera definicje parametrów walidacyjnych, czyli informacje podstawowe. W rozdziale 4.4.3 „Analiza dyskryminacyjna i klasyfikacyjna” dużo uwagi poświęcono rozważaniom ogólnym, częściowo powtarzając informacje z rozdziału 3.5. Wolałbym, żeby autorka podawała tu konkretne informacje o swoich obliczeniach, np. zamiast napisać „Optymalną kompleksowość ostatecznego modelu PLS-DA wybiera się na podstawie analizy wyznaczonych właściwości predykcyjnych (Rysunek 16).” (str. 77) należało skomentować uzyskane rezultaty i napisać jaką liczbę zmiennych uwzględnił model i dlaczego na taką właśnie liczbę się zdecydowano. Opis oznaczeń analitycznych i pomiarów fizykochemicznych jest klarowny, część chemometryczna mniej.

W części teoretycznej bardzo wiele uwagi autorka poświęciła nie tylko analizie chemicznej środków ochrony roślin, ale także zagadnieniom formalnym i prawnym. Są to istotne kwestie, uzasadniające celowość podjętych przez autorkę prac. Ta część napisana jest dobrze, choć nie zawsze tytuły podrozdziałów są adekwatne do zawartych w nich treści. Np. w rozdziale 3.4. „Metody oznaczeń parametrów fizykochemicznych” zostały wymienione fizyczne i chemiczne właściwości środków ochrony roślin, które należy określić wg Rozporządzenia Komisji UE, ale nie napisano nic o samych metodach tych oznaczeń. Rozdział 3.5. „Metody oznaczania zanieczyszczeń chemicznych w środkach ochrony roślin” obejmuje szerszy zakres materiału niż same metody.

Literatura została dobrana właściwie. Niektóre notki bibliograficzne są niekompletne, np. poz. 98-100 zawierają tylko nazwisko pierwszego autora. Nie zachowano jednolitego wzorca notek, w podanych pozycjach [98-100] występują dwa skróty oznaczające to samo:

„i inni” albo „et al”. Nazwiska autorów danej pracy rozdzielane są zazwyczaj przecinkami, choć niekiedy zdarza się spójnik „i” (np. [120]) lub „&” (np. [103]).

Na uznanie zasługuje bardzo ładna szata graficzna pracy, czytelne tabele i staranne rysunki. Wzory matematyczne i symbole są zrozumiałe, choć pisane niezgodnie z obowiązującymi konwencjami. Wg IUPAC² symbole wielkości fizykochemicznych powinny być drukowane kursywą. Autorka stosuje pismo półtłuste do symboli tensorów dowolnego rzędu, podczas gdy dla skalarów powinno stosować się pismo o normalnej grubości. Należy także unikać symboli składających się z wielu znaków pisanych w jednej linii.

Drobne błędy i pomyłki są nieliczne, np. „pierwsze próby praktyki rolniczej podjęto w 8 w p.n.e.” (str. 19; chodziło zapewne o tysiąclecie), wzór DDT to $C_{14}H_9Cl_5$ (a nie $C_{14}H_9C_{15}$; str. 22), a równanie 8 na str. 60 daje Z w %, a nie g/l. Przykrym błędem językowym jest używanie słowa „dedykowany” w znaczeniu „przeznaczony” czy „specjalny” (np. str. 14 i 74).

Kończąc recenzję chcę podkreślić, że moje uwagi krytyczne nie powinny sprawiać wrażenia, że pracy nie oceniam wysoko. Tak nie jest – jeśli jakieś zagadnienie nie budzi wątpliwości, to w recenzji traktuje się je zdawkowo bądź pomija, ale krytyka zajmuje wiele miejsca. Reasumując: za główne osiągnięcie autorki uważam zaproponowanie metody oznaczania azoksystrobiny (izomeru E) jako substancji czynnej oraz Z -azoksystrobiny i toluenu jako zanieczyszczeń w środkach ochrony roślin oraz jej zweryfikowanie, a także wykazanie, że metoda może być zastosowana do preparatów zawierających obok azoksystrobiny chlorotalonil, cyprokonazol, difenokonazol, epoksykonazol, izopirazam, propikonazol i tebukonazol. Pionierska próba zastosowania metod chemometrycznych do weryfikacji oryginalności środków ochrony roślin zasługuje na uznanie. Sama praca jest dobrze napisana, bibliografia obejmuje właściwie dobrane publikacje. Świadczy to o dobrym przygotowaniu autorki do pracy naukowej.

² Quantities, Units, and Symbols in Physical Chemistry, IUPAC Green Book, 3rd edition, prepared for publication by E.R. Cohen, T. Cvitas, J.G. Frey, B. Holmstrom, K. Kuchitsu, R. Marquardt, I. Mills, F. Pavese, M. Quack, J. Stohner, H. Strauss, M. Takami, and A.J. Thor, RSC Publishing, 2007 [ISBN 0 85404 433 7; ISBN-13 978 0 85404 433 7; patrz także: <https://iupac.org/wp-content/uploads/2019/05/IUPAC-GB3-2012-2ndPrinting-PDFsearchable.pdf>

Stwierdzam zatem, że spełnione zostały wymogi stawiane rozprawom doktorskim i określone w ustawie o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku (Dz. U. nr 65, poz. 595) z późniejszymi zmianami (Dz.U. 2017 poz. 859) oraz wymogi zwyczajowe i wnoszę o dopuszczenie pani mgr Patrycji Marczewskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Wojciech Marchant