

Prof. dr hab. inż. Henryk Jeleń
Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Ul. Wojska Polskiego 31, 60-624-Poznań
Tel: 061-8487273
Fax: 061-8487314
E-mail: henrykj@up.poznan.pl
www.volatilomics.puls.edu.pl

Poznań, 4 września 2022

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Anny Marleny Piasty pt. „Opracowanie nowych i modyfikacja stosowanych procedur oznaczania amin biogennych w żywności” wykonanej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem promotora, prof. dr hab. Edwarda Szłyka i promotora pomocniczego dr hab. Anny Jastrzębskiej, prof. UMK.

Aminy biogenne stanowią ważną grupę związków w żywności z uwagi na ich rolę jako prekursorów szeregu metabolitów, a także często negatywne oddziaływanie na organizm ludzki. Powstają one w żywności głównie w wyniku dekarboksylacji aminokwasów, aminacji i transaminacji aldehydów i ketonów. Ich tworzenie odbywa się na drodze enzymatycznej, często katalizowanej przez mikroorganizmy. Do głównych amin biogennych występujących w żywności, których analityką zajęła się w swojej pracy doktorantka zalicza się histaminę, tyraminę, tryptaminę, putrescynę, kadawerynę, sperminę i spermidynę. Histamina wśród amin biogennych postrzegana jest za najbardziej istotną z punktu widzenia jej oddziaływania na organizm człowieka. Histamina jest trudna do usunięcia z produktów spożywczych w procesie ich obróbki. Z uwagi na jej rolę w nietolerancji żywności w wielu krajach jej zawartość jest normowana, szczególnie w mięsie ryb. Aminy stanowią także bardzo istotną grupę substancji o charakterze neuroprzebieżników (histamina, serotonina, neurotransmitery katecholaminowe). Głównymi produktami, w których występują aminy biogenne jest mięso głównie ryb, sery, jaja, produkty poddane procesom fermentacyjnym, w tym wina.

Odzwierciedleniem popularności amin biogennych jako tematu badań jest liczba publikacji na ten temat. W bazie Web of Science znajdujemy ponad 13 000 rekordów mających w temacie aminy biogenne, w tym prawie 1200 artykułów przeglądowych (dane na dzień 1.09.2022). Prace na temat amin biogennych obejmują zarówno te, dotyczące występowania w żywności, metod analitycznych wykorzystywanych do ich wykrywania oraz amin i ich pochodnych, pełniących rolę neuroprzebieżników. Powyższa baza literaturowa ukazuje ponad 1300 publikacji poświęconych analizie amin biogennych za pomocą HPLC, prawie 600 opisujących wykorzystanie metod elektromigracyjnych, ponad 200 dla GC oraz prawie 150

dla GC/MS. Chromatografia cieczowa z różnymi rodzajami detekcji jest dominującą techniką w analityce tych związków. Z uwagi na brak innych niż aminowa grup funkcyjnych do wykrywania amin biogennych, szczególnie za pomocą HPLC wykorzystuje się różne metody tworzenia pochodnych, najczęściej stosując chlorek dansylu, rzadziej OPA (o-ftalaldehyd), czy FMOC (chlorek 9-fluorenylometoksy karbonylu) – ostatnie dwa rutynowo stosowane także do analizy aminokwasów za pomocą HPLC. Opracowano także metody wykrywania amin biogennych, głównie histaminy, opartych na testach ELISA, pomiarach kolorymetrycznych, elektrochemicznych, lub opartych na biosensorach.

Zagadnienie tworzenia, występowania i wykrywania amin biogennych w żywności, choć szeroko opisane w literaturze jest nadal aktualne z punktu widzenia bezpieczeństwa żywności oraz interesujące z punktu widzenia analityki żywności. Dlatego uważam wybór takiego tematu pracy doktorskiej za słuszny, szczególnie w aspekcie poszukiwania nowych metod analizy tych związków.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska ma formę zbioru 5 publikacji opatrzonych wprowadzeniem, przedstawieniem hipotez badawczych i celu rozprawy, omówieniem wyników badań, dyskusją oraz podsumowaniem i wnioskami. Forma przygotowania pracy będącej zbiorem publikacji jest poprawna jeśli chodzi o strukturę, zakres i objętość poszczególnych części. Praca jest obszerna – całość obejmuje 165 stron. Składa się na nią 11 stronicowy wstęp, 2 stronicowe przedstawienie hipotez badawczych i celu pracy po których następuje 20 stronicowe omówienie i dyskusja wyników zamieszczonych w publikacjach. Zamieszczone kopie publikacji razem z materiałami dodatkowymi zajmują 97 stron. Podsumowanie i wnioski zajmują 3 strony. Spis literatury wykorzystanej w pracy liczy 84 pozycje. Dwujęzyczne streszczenie, szczegółowe omówienie dorobku naukowego oraz oświadczenia współautorów dopełniają pracę.

Wprowadzenie do pracy daje czytelnikowi dobry wstęp do tematyki występowania, nomenklatury i właściwości amin biogennych. Autorka w bardzo dużym skrócie podkreśla rolę mikroorganizmów w tworzeniu amin w żywności, znaczenie amin jako wskaźników świeżości żywności, a także ich rolę w zatruciach i alergiach pokarmowych. Rozdział ten mógłby być bardziej rozbudowany, co uwydatniłoby ważność podjętego tematu. Więcej miejsca autorka poświęca przeglądowi metod oznaczania amin biogennych przedstawiając w formie tabelarycznej parametry ich oznaczania techniką chromatografii jonowej, sensorów (głównie amperometrycznych), metod elektroforetycznych oraz magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR). Najwięcej uwagi poświęcono omówieniu metod tworzenia pochodnych przedstawiając prace z wykorzystaniem różnych odczynników do ich syntezy. Hipotezy badawcze oparte na przeglądzie literatury skupiały się na odpowiedzi na następujące pytania: *i)* - Czy można otrzymać nowe pochodne amin biogennych dające

porównywalne lub lepsze wyniki w oznaczeniach techniką HPLC; *ii*) - Jak można zmodyfikować etap przygotowania próbek do oznaczania amin biogennych, by poprawić parametry analizy ilościowej, oraz; *iii*) – Czy można zastosować inne metody analityczne do oznaczania amin biogennych w żywności, odmienne od dotychczasowo stosowanych. Pochodną wysuniętych hipotez był cel badań skupiający się na opracowaniu procedur tworzenia nowych pochodnych amin biogennych w derywatywacji przedkolumnowej, opracowaniu metod przygotowania próbek do analizy technikami izotachoforezy kapilarnej, chromatografii cieczowej i spektroskopii ¹⁹F NMR, które byłyby zarówno szybkie, dokładne jak i precyzyjne. Dla wszystkich opracowanych metod sprawdzono ich działanie w odniesieniu do wybranych grup produktów spożywczych.

Drobne uchybienia edytorskie w tej części pracy:

Rysunek 1. Pierwszy wzór przedstawia 2-feniloetyloaminę, a nie fenyloalaninę.

Str 7. Bardziej poprawną formą jest aminacja i transaminacja aldehydów i ketonów, a nie aminowanie i transaminowanie.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy to cykl 5 artykułów opublikowanych w latach 2012-2018:

1. Jastrzębska A., Kurzawa M., **Piasta A.**, Szłyk E. Determination of histamine in some foods by isotachophoretic method with simple sample preparation. *Food Analytical Methods*, 2012, 5, 1079-1087 [Q2 Food Science (103/335)]
2. Jastrzębska A, **Piasta A.**, Szłyk, E. Simultaneous determination of selected biogenic amines in alcoholic beverage samples by isotachophoretic and chromatographic methods. *Food Additives and Contaminants – Part A. Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 2014, 31, 83-92. [Q2 Chemistry (miscellaneous), Q2 – Food Science (102/335), w momencie publikacji Q1]
3. **Piasta A.M.**, Jastrzębska A., Krzemiński M.P. Muzioł T.M. Szłyk E. New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 834, 58-66 [Q1 – Analytical Chemistry (14/124)]
4. Jastrzębska A., **Piasta A.**, Kowalska S., Krzemiński M., Szłyk E. A new derivatization reagent for determination of biogenic amines in wines. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, 48, 111-119. [Q1 Food Science (71/335)]
5. Jastrzębska A., **Piasta A.**, Krzemiński M., Szłyk E. Application of 3,5-bis-(trifluoromethyl)phenyl isothiocyanate for the determination of selected biogenic amines by LC-tandem mass spectrometry and ¹⁹F NMR. *Food Chemistry*, 2018, 239, 225-233 [Q1 Food science (11/335), Q1 – Analytical Chemistry (10/124)]

Doktorantka jest pierwszym autorem w tylko jednej publikacji, w pozostałych pracach pierwszym autorem jest dr hab. Aneta Jastrzębska, prof. UMK pełniąca rolę promotora pomocniczego w niniejszym postępowaniu. Dr hab. Aneta Jastrzębska jest autorem korespondencyjnym we wszystkich pięciu pracach.

O ile autorem korespondencyjnym publikacji doktoranta z reguły jest promotor, ew. promotor pomocniczy to trochę dziwi mnie, że doktorantka jest pierwszym autorem tylko jednej pracy. Z reguły w pracach doktorskich będących kompilacją publikacji doktorant jest pierwszym autorem większości, jeśli nie wszystkich prac. W takich przypadkach rola doktoranta w pracy jest ewidentna, z reguły sugerująca, że doktorant wykonuje większość doświadczeń i pisze przynajmniej wstępną wersję manuskryptu. W pracy doktorskiej autorka podaje, że publikacje powstały w wyniku realizacji projektu NCN Preludium 9 (2016-2017), którego doktorantka była kierownikiem. Tym bardziej dziwi mnie pozycja doktorantki na liście autorów publikacji tworzących rozprawę doktorską.

Ponadto, publikacje 1-4 stanowiły 1/3 prac, na podstawie których promotor pomocniczy uzyskała stopień doktora habilitowanego na podstawie osiągnięcia naukowego pt. „Nowe procedury oznaczania wybranych składników żywności o właściwościach pro- i antyzdrowotnych” (Uchwała nr 47/2017/18 Rady Wydziału Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu z dnia 12 września 2018).

Z powyższych względów istotne jest określenie udziału doktorantki w realizacji prac wchodzących w skład rozprawy. Informacje dotyczące wkładu doktorantki w realizację poszczególnych prac zostały umieszczone w rozprawie doktorskiej (str. 20-21), zostały także wyjaśnione na wniosek recenzenta. Informacje na temat wkładu poszczególnych autorów w publikacje wchodzące w skład doktoratu zostały szczegółowo określone i ujęte w oświadczeniach współautorów zamieszczonych w rozprawie (str. 159-165).

W świetle istniejących przepisów dana publikacja może zostać wykorzystana przez więcej niż jednego autora w postępowaniu o nadanie stopnia doktora lub doktora habilitowanego, aczkolwiek jasno określony powinien być zakres pracy wykonywanych w realizacji danej publikacji w tym wypadku przez doktoranta, tym bardziej, gdy nie jest to praca interdyscyplinarna z narzucającym się podziałem ról autorów.

Po wnikliwym zapoznaniu się z publikacjami, oświadczeniami współautorów i autorki rozprawy doktorskiej stwierdzam, że wkład doktorantki w realizację badań nad aminami biogennymi i wynikającymi z tych badań był znaczny, uzasadniający włączenie tych prac w zakres rozprawy doktorskiej, szczególnie w odniesieniu do prac 3-5.

Wszystkie prace wchodzące w zakres rozprawy doktorskiej ukazały się w czasopiśmie znajdujących się na liście JCR, więc zostały zrecenzowane przez co najmniej dwóch recenzentów. Z obowiązku recenzenta rozprawy zamieszczam poniżej moją ocenę i uwagi dotyczące poszczególnych prac.

Pierwsza publikacja dotyczy wykorzystania izotachforezy kapilarnej z detekcją konduktometryczną do badania zawartości histaminy w próbkach żywności. Główną zaletą opracowanej metody jest prosty sposób przygotowania próbki, sprowadzający się do

ekstrakcji kwasem trichlorooctowym, wirowaniu i filtracji. Autorzy wybrali do ekstrakcji 2% kwas trichlorooctowy, z uwagi na jego zdolność do wytrącania białek. Opracowana metoda charakteryzuje się granicą wykrywalności na poziomie 7.01mg/L, liniowością w zakresie 5 – 50mg/L. Opracowaną metodę wykorzystano do oznaczania histaminy w próbkach mięsa różnego pochodzenia (indyk, kurczak, wołowina, wieprzowina), wyrobów mięsnych, ryb (łosoś wędzony, makrela), oraz serów pleśniowych. Jako metodę referencyjną wykorzystano chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz z detekcją UV. W obu metodach nie stosowano derywatywacji. Metody te charakteryzowały się zbliżonymi parametrami analitycznymi (granica wykrywalności, oznaczalność, powtarzalność, dokładność, odzysk). Opracowana metoda jest prosta wykorzystująca izotachoforezę, nie wymaga derywatywacji do analizy histaminy, a oznaczenia nie zakłócają niskocząsteczkowe peptydy lub aminokwasy.

Druga publikacja odnosi się do wykorzystania izotachoforezy do oznaczania wybranych amin biogennych (histaminy, tyraminy, kadaweryny, putrescyny, tryptaminy, 2-fenyletyloaminy, sperminy i spermidyny) w napojach alkoholowych (próbki wina i piwa). Wyniki oznaczeń elektroforetycznych porównano z wynikami oznaczeń za pomocą HPLC, po derywatywacji próbek chlorkiem dansylu. Odczynnik ten wykorzystywany jest powszechnie do tworzenia pochodnych amin aromatycznych i alifatycznych w reakcji z pierwszorzędowymi i drugorzędowymi aminami dający stabilny addukt sulfonamidowy. W metodzie wykorzystującej izotachoforezę nie można było rozdzielić sperminy od spermidyny (podobnie jak w prezentowanym rozdziale HPLC), ponadto w HPLC nie uzyskano rozdzielenia 2-fenyletyloaminy i putrescyny. Dla obu metod granice oznaczalności były wystarczające do oceny zawartości amin biogennych w żywności, ale dla izotachoforezy kilkukrotnie niższe wartości progów oznaczalności określono m. in. dla histaminy, tyraminy, kadaweryny. W opracowanej metodzie wykorzystano zagęszczanie próbki na kolumnie wstępnej przed analizą na kolumnie analitycznej, co umożliwia analizę amin biogennych obecnych w niskich stężeniach. W odniesieniu do analizowanych próbek wina i piwa, w wypadku niskich stężeń histaminy, kadaweryny i tyraminy metoda oparta na izotachoforezie kapilarnej pozwalała na ich oznaczenia ilościowe, co było nieosiągalne techniką HPLC. Wykazano bardzo dobrą przydatność opracowanej metody opartej na izotachoforezie to oznaczania amin biogennych w napojach alkoholowych.

Trzecia publikacja dotyczy oznaczania wybranych amin biogennych (histaminy, fenyletyloaminy tyraminy i tryptaminy) w winach za pomocą HPLC wykorzystując do ich detekcji pochodne z CNBF (2-chloro, 1,3-dinitro-5-(trifluorometylo) benzen). Uzyskane pochodne amin zostały scharakteryzowane za pomocą metod krystalograficznych i magnetycznego rezonansu jądrowego (^1H , ^{13}C , ^{19}F NMR). Nowością metody jest stosowany odczynnik do derywatywacji i wyczerpująca charakterystyka spektralna pochodnych. Praca ta

ukazała się w czasopiśmie *Analytica Chimica Acta*, uznawanym w społeczności akademickiej za jedno z czołowych czasopism w obszarze chemii analitycznej, szczególnie metod przygotowania próbek. Przeprowadzono syntezę pochodnych amin z CNBF, zbadano ich właściwości spektralne, co jest jednym z głównych elementów pracy. Właściwości spektralne otrzymanych pochodnych zostały szczegółowo opisane w materiałach dodatkowych do w/w pracy zamieszczonych a stronach 73-82 rozprawy doktorskiej. Choć metoda charakteryzuje się niskimi progami oznaczalności (0.02 – 0.03mg/L), bardzo wysokimi odzyskami i zakresem liniowości od ok. 0.10 – 9.00 mg/L, proces przygotowania próbek do analizy obejmujący ekstrakcję, usuwanie rozpuszczalnika, otrzymywania pochodnych jest dość uciążliwy i długotrwały. Otrzymane pochodne CNBF amin biogennych stanowią o selektywności metody, z uwagi na dość złożony proces przygotowania próbek (m. in. 2-godzinne ogrzewanie pod chłodnicą zwrotną) może nie być konkurencyjna wobec standardowych metod opartych na klasycznych metodach derywatywacji (DNSC, OPA).

Czwarta publikacja zamieszczona w czasopiśmie *Journal of Food Composition and Analysis* dotyczy wykorzystania nowego odczynnika do derywatywacji (1-fluoro-2-nitro-4-(trifluorometylo) benzenu, FNBT) w oznaczaniu zawartości wybranych amin biogennych (takich samych jak w publikacji nr 3) w winach za pomocą HPLC z detekcją UV. Schemat pracy jest podobny do poprzedniej, ze szczegółową charakterystyką spektralną otrzymanych pochodnych, oraz przedstawieniem najważniejszych parametrów walidacyjnych opracowanej metody. Zakres liniowości opracowanej metody jest znacznie niższy (ok. 0.04 – 0.60 mg/L) niż metody opisanej w pracy nr 3 z derywatywacją za pomocą CNBF (ok. 0.09 – 9.00 mg/L). Zaletą opracowanej metody względem tej z wykorzystaniem CNBF są niższe granice wykrywalności i oznaczalności, a także uproszczenie i skrócenie procedury przygotowania próbek.

Piąta publikacja wchodząca w zakres rozprawy doktorskiej to praca zamieszczona w czasopiśmie *Food Chemistry* dotycząca wykorzystania do derywatywacji 4 amin biogennych badanych wcześniej (publikacje 3 i 4) izotiocyjanianu 3,5-bis-(trifluorometylo)fenylu (BPI). Pochodne uzyskane w tej reakcji były analizowane za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Połączenie derywatywacji z selektywną detekcją stanowi o selektywności całej metody, w której możliwe było dzięki tym krokom zrezygnowanie z etapu oczyszczania próbek. Dodatkowo w pracy określono przydatność ^{19}F NMR do oznaczania sumy amin biogennych (w postaci otrzymanych pochodnych) w napojach alkoholowych. W publikacji, podobnie jak w poprzednich dwóch pracach przeprowadzono syntezę pochodnych, szczegółowo je scharakteryzowano pod kątem właściwości spektralnych (materiały uzupełniające – str. 110 – 139 rozprawy doktorskiej). Metoda charakteryzowała się bardzo niskimi limitami detekcji (ok. 0.003mg/L), co niewątpliwie jest wynikiem wykorzystania w detekcji tandemowej spektrometrii mas oraz

liniowością w zakresie ok. 0.01 – 0.2mg/L), co też jest z pewnością wynikiem wybranego rodzaju detekcji. W porównaniu do wcześniejszych prac (nr 3 i 4) opracowana metoda oparta na derywatacji z BPI cechuje się dużą reaktywnością z odczynnikami derywatającymi, brakiem produktów ubocznych oraz wysoką czułością. Bardzo ciekawym elementem pracy jest określenie całkowitej zawartości amin biogennych w oparciu o wykorzystanie ^{19}F NMR.

Publikacje stanowiące pracę doktorską zawierają w sobie znaczny ładunek nowości naukowej, są interesujące i wnoszą nowe elementy do analityki amin biogennych, szczególnie w obszarze przygotowania próbek - derywatacji przedkolumnowej.

Szczególnie wysoko oceniam:

- opracowanie nowych metod analizy amin biogennych z tworzeniem nowych pochodnych przedstawionych w pracach 3-5, pozwalające na ich selektywną analizę w napojach alkoholowych,
- opracowanie procedury przygotowania próbek o dużej zawartości białka i tłuszczu do oznaczania amin biogennych techniką izotachoforezy
- Opracowanie procedury oznaczania wybranych amin za pomocą HPLC bez etapu tworzenia pochodnych
- Opracowanie nowej i szybkiej metody oznaczania sumarycznej zawartości amin biogennych z wykorzystaniem techniki ^{19}F NMR.

Należy podkreślić, że w skład rozprawy wchodzi 5 publikacji, co jest dużym osiągnięciem. Co więcej, są to prace publikowane w dobrych i bardzo dobrych czasopismach z obszaru chemii analitycznej i nauk o żywności. Spośród opublikowanych prac wyróżniłbym prace 3, 4 i 5 publikowane odpowiednio w *Analytica Chimica Acta*, *Journal of Food Composition and Analysis* i *Food Chemistry*.

Biorąc pod uwagę powyższe informacje pozytywnie oceniam rozprawę doktorską. Spełnia ona wymagania stawiane pracom doktorskim, w tym zamieszczone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne na Wydziale Chemii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika o dopuszczenie pani mgr Anny Marleny Piasty do dalszych etapów postępowania o ubieganie się o nadanie stopnia naukowego doktora.

Henryk Jeleń