



UNIwersytet Medyczny

IM. PIASTÓW ŚLĄSKICH WE WROCLAWIU

Wydział Farmaceutyczny
Katedra i Zakład Chemii Fizycznej i Biofizyki
Kierownik: prof. dr hab. Witold Musiał

Wrocław, dn. 17 kwietnia 2024 r.

Recenzja osiągnięcia naukowego
magistra inżyniera Andrzeja Kwaśnicy
pt.: „**Opracowanie procedur określania pochodzenia materiału roślinnego metodami chromatograficznymi i genetycznymi**”,
w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauki: nauki rolnicze, w
dyscyplinie: technologia żywności i żywienia

Wprowadzenie

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, pt.: „Opracowanie procedur określania pochodzenia materiału roślinnego metodami chromatograficznymi i genetycznymi”, w postępowaniu w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauki: nauki rolnicze, w dyscyplinie: technologia żywności i żywienia, w postaci książki z włączonymi tekstami trzech publikacji, oraz opisem innych badań, stanowi utwór, który częściowo został opublikowany w recenzowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych o wysokiej renomie w Europie i na świecie. Praca została zrealizowana w ramach studiów doktoranckich - doktoratu wdrożeniowego, na Wydziale Biotechnologii i Nauk o Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, po opiece promotorską prof. dr hab. inż. Antoniego Szumnego i opiekuna pomocniczego dr n.med. Agnieszki Pileckiej. Kandydat do stopnia doktora jest pierwszym autorem w tych trzech publikacjach (**D1-D3**). Oznaczenia publikacji recenzent identyfikuje w kolejnych częściach swojej opinii.

Cel i metody badań

Kandydat deklaruje jako cel swojej pracy badawczej, której zwieńczeniem na tym etapie ma być stopień doktora m.in. „opracowanie metod analizy materiałów roślinnych [...] umożliwiających ich jednoznaczną identyfikację”, przy czym skupił się On na konopiach jako roślinie najczęściej badanej w ramach analiz prowadzonych przez macierzyste przedsiębiorstwo Doktoranta. Jak słusznie wskazuje Kandydat, oczekiwania zlecniodawców badań materiału roślinnego coraz częściej obejmują określanie podobieństwa badanych próbek konopi lub wskazywanie źródła ich pochodzenia. Wobec tego Doktorant wytypował jako główny problem badawczy identyfikację zmian jakościowych i ilościowych niektórych metabolitów wtórnych powstających w biegu suszenia i przechowywania materiału metodą chromatografii gazowej, sprzężonej ze spektrometrem masowym (GC-MS). Dalszym celem badania tzw. metabolitów markerowych, w tym związków lotnych, fitosteroli oraz kannabinoidów stało się umożliwienie

w przyszłości ustalenia „odcisku palca” badanych materiałów. Metody badawcze, poza wymienionym GC-MS, obejmowały pomysłowe wykorzystanie NMR oraz narzędzi analizy materiału genetycznego, tj. technikę analizy sekwencji mikrosatelitarnych (STR), co miałyby pozwolić na różnicowanie roślin w obrębie tej samej odmiany. Ostatecznym celem użytecznym prowadzonych badań, w ramach tzw. doktoratu wdrożeniowego, było jednak opracowanie metody umożliwiającej porównanie próbek materiału roślinnego z sobą, oraz wskazanie źródła pochodzenia określonej próbki.

Osiągnięcie naukowe

Publikacje stanowiące osiągnięcie naukowe recenzent zestawia w poniższej tabeli.

Lp.	Dane bibliograficzne pracy badawczej
D1	Kwaśnica, Andrzej, Natalia Pachura, Klaudia Masztalerz, Adam Figiel, Aleksandra Zimmer, Robert Kupczyński, Katarzyna Wujcikowska, Angel A. Carbonell-Barrachina, Antoni Szumny, and Henryk Różański. "Volatile composition and sensory properties as quality attributes of fresh and dried hemp flowers (<i>Cannabis sativa</i> L.)." <i>Foods</i> 9, no. 8 (2020): 1118.
D2	Kwaśnica, Andrzej, Mirosława Teleszko, Damian Marcinkowski, Dominik Kmieciak, Anna Grygier, and Wojciech Golimowski. "Analysis of changes in the amount of phytosterols after the bleaching process of hemp oils." <i>Molecules</i> 27, no. 21 (2022): 7196.
D3	Kwaśnica, Andrzej, Natalia Pachura, Angel A. Carbonell-Barrachina, Hanán Issa-Issa, Dorota Szumny, Adam Figiel, Klaudia Masztalerz, Marta Klemens, and Antoni Szumny. "Effect of Drying Methods on Chemical and Sensory Properties of <i>Cannabis sativa</i> Leaves." <i>Molecules</i> 28, no. 24 (2023): 8089.
D4	Dane badawcze przedstawione w opisowej części rozprawy doktorskiej, niepublikowane w ww. artykułach.

Doktorant pracę badawczą **D1** nakierował na proces suszenia kwiatów konopi, które mają szerokie zastosowanie w kosmetyce, żywności i przemyśle farmaceutycznym. W badaniu Kandydat sprawdził siedem wariantów suszenia kwiatów konopi, obejmujących suszenie konwekcyjne, suszenie próżniowo-mikrofalowe oraz suszenie kombinowane, składające się z wstępnego suszenia konwekcyjnego, a następnie końcowego suszenia próżniowo-mikrofalowego. Dla każdego procesu Doktorant zastosował model dwutermiowy. Wyszuszony materiał poddano ocenie barwnej i chromatograficznej. Analizy otrzymanego olejku eterycznego wykazały obecność 93 związków lotnych, głównie β -mircenu, limonenu i β -(E)-kariofilenu, a także α -humulenu. Zastosowanie mocy 240 W podczas suszenia próżniowo-mikrofalowego i 50°C podczas suszenia konwekcyjnego dało największą retencję związków aromatycznych, wynoszącą odpowiednio 85 i 76%, ale przy ogromnych zmianach barwy. Dodatkowo analiza sensoryczna wykazała, że suszenie mocą mikrofal 240 W daje produkt najbardziej zbliżony do świeżego surowca.

Pracę badawczą **D2** Kandydat ukierunkował na badania analizy wpływu zmiany zawartości fitosteroli po procesie bielenia olejów konopnych odmian Finola, Earlina 8FC i Secuieni Jubileu. Surowe oleje roślinne tłoczone na zimno i na gorąco bielono wybraną ziemią bielącą w dwóch stężeniach. Ziemią bielącą po-procesową ekstrahowano metanolem. Ilość fitosteroli w surowych olejach i ekstrakcie po przemyciu ziemi bielącej metanolem analizowano metodą chromatografii gazowej. Z przeprowadzonych badań wynika, że proces bielenia nie wpłynął istotnie na ubytek fitosteroli w olejach. Śladowe ilości fitosteroli pozostają na ziemi bielącej i dzięki ekstrakcji metanolem mogą zostać wyekstrahowane z oleju. Według Kandydata bielenie oleju konopnego nie powoduje jego wyczerpania, a znacząco poprawia właściwości organoleptyczne. Proces bielenia oleju powoduje utratę oleju mniejszą niż 2%

wagowych bielonego oleju, przy czym strata ta zależy od rodzaju użytej ziemi bielącej. Utrata fitosteroli po procesie bielenia wynosiła średnio $2,69 \pm 0,69\%$ i zależała od rodzaju zastosowanej ziemi bielącej oraz oleju ekstrahowanego z różnych odmian nasion konopi.

W pracy **D3** Kandydat deklaruje, że po raz pierwszy przedstawia wyniki oceny metod suszenia, takich jak: konwekcyjne, próżniowo-mikrofalowe, kombinowane konwekcyjne suszenie wstępne oraz próżniowo-mikrofalowe suszenie końcowe, oraz wpływ tych metod na zmiany jakościowe i ilościowe metabolitów wtórnych, w tym olejów, kannabinoidów i steroli. Autor przeprowadził także test rankingowy i opisowy liści konopi, a kinetykę suszenia przedstawił za pomocą trzech modeli. Technika SPME-Arrow oznaczył 41 związków lotnych, z których w liściach suszonych i świeżych dominowały kariofilen, β -myrcen i α -humulen. Spośród otrzymanych olejków eterycznych zidentyfikował Doktorant 64, wśród których dominował kariofilen, epoksyd humulenu II i limonen. Dla zachowania jak największej ilości olejów najlepszą metodą było wstępne suszenie konwekcyjne, a następnie łączone suszenie próżniowo-mikrofalowe, w którym retencja związków lotnych wyniosła 36,08%, natomiast metody suszenia konwekcyjnego i próżniowo-mikrofalowego spowodowały największą stratę wynoszącą 83%. Dominującymi kannabinoidami w świeżych liściach konopi były CBDA 6,05 i CBD 2,19 mg/g. Suszenie nie spowodowało zmian w profilu kannabinoidowym materiału roślinnego. We frakcji fitosterolowej i triterpenowej dominowały β -sitosterol, kampesterol i lupeol. W żadnym ze znalezionych wariantów Autor nie zaobserwował zmian jakościowych ani ilościowych.

Dane badawcze uzyskane w ramach prac nieopublikowanych w czasopiśmie, **D4**, obejmują szereg eksperymentów które miały na celu ocenę wpływu czynników zewnętrznych na konopie tj. na ich profil metabolitów wtórnych, w tym z zastosowaniem metod NMR i genetycznych. Autor postawił tezę, że może to prowadzić do generowania w materiale roślinnym specyficznych cech „indywidualnych” – wg. Kandydata ogromna różnorodność jakościowa i ilościowa zewnętrznych czynników, winna pozostawić unikalny ślad w profilu metabolitów wtórnych materiałów roślinnych. Doktorant wykorzystał tę możliwość, co umożliwiło analizę porównawczą prób.

Uwagi

Doktorant nie ustrzegł się wyrażen żargonowych, jak np.: „Stan prawny w Polsce w kontekście roślin”, „Widma masowe w przypadku techniki GC/MS zbiera się standardowo od 40 do 600 m/z”, „stan pary”, „Przytłaczająca większość opisanych w literaturze metody bazowały na gradiencie dwóch w/w rodzajów faz ruchomych [...]”, „W przypadku materiałów silnie zmienionych mechanicznie czy biologicznie [...]”, „form kwaśnych kannabinoidów”. W tabeli 3 nie wyjaśniono małej litery „a” w nazwach kannabinoidów.

Ponadto, trudno zgodzić się z Autorem, że „Kwestie obrotu oraz posiadania a także przetwarzania materiałów roślinnych, jak już wspomniano reguluje w Polsce kilka aktów prawnych, z których najważniejszym jest Ustawa o Przeciwdziałaniu narkomanii z dnia 29 lipca 2005r.”, bowiem materiały roślinne to nie tylko surowce o potencjalnym działaniu psychogennym, a ich produkcja i dystrybucja jest regulowana przez wiele aktów normatywnych. Nie jest jasne, dlaczego Autor odwołuje się we wstępie do „Ustawy o ochronie zdrowia przed następstwami palenia tytoniu i wyrobów tytoniowych”. Dlaczego jeden z rozdziałów zatytułowano: „Chemizm najważniejszych roślin”?

Recenzent wyraża ubolewanie, że Kandydat nie odniósł się rzeczowo do problemów, z którymi boryka się współczesny świat, a związanych z nadmiarem lub niedoborem sankcji oraz mechanizmów penalizacji stosowania i nadużywania produktów, i substancji pochodzących z konopi. Cechą dobrze wykształconego doktora jest zdolność do wyrażania opinii etycznych, oraz prowadzenie racjonalnej i zobiektywizowanej dyskusji, a

także do przedstawiania i rozumienia dyskursu społecznego pochodzącego z różnych stron sceny społecznej i politycznej. Zabrakło tej części dyskusji w tekście pracy doktorskiej.

Do bliższego wyjaśnienia pozostaje ponadto kwestia poruszona w pracy D2 w której, wg Kandydata, bielenie oleju konopnego nie powoduje jego wyczerpania, a znacząco poprawia właściwości organoleptyczne, przy czym utrata oleju jest mniejsza niż 2% wagowych bielonego oleju – tutaj recenzent oczekiwałby szerszej interpretacji, dlaczego utrata mogłaby mieć walor niekorzystny dla ewentualnych celów użytkowych, oraz jaki jest kontekst etyczno-prawny dostępności takiego produktu.

Dorobek i wdrożenie

Zgodnie z dostarczoną dokumentacją Kandydat uzyskał 28,30 pkt IF i 840 pkt MEiN publikując 6 artykułów, z czego trzy zostały uwzględnione w treści pracy doktorskiej. W badaniach wykonanych w ramach opinii kryminalistycznych dla takich jednostek jak: Prokuratora Rejonowa, Komenda Powiatowa Policji, Komisariat Policji, Kandydat zadeklarował wykorzystanie wyników prac prowadzonych w realizowanym projekcie Doktorat Wdrożeniowy, oraz przedstawił obszar wdrożenia, wraz z procedurami badawczymi i instrukcjami analitycznymi stosowanymi w przedsiębiorstwie, w którym nastąpiło wdrożenie.

Podsumowanie

Praca jest w swojej całości bardzo ciekawa i z jednej strony pokazuje warsztat naukowy wykorzystywany w ocenie kryminalistycznej niektórych próbek dowodowych, z drugiej zaś strony jest potwierdzeniem, że złożone metody badawcze, charakterystyczne dla nauk farmaceutycznych i chemicznych, mogą być z powodzeniem wykorzystane i zastosowane w praktyce urzędowej organów śledczych i sądowych RP. Recenzent pragnie pochwalić Kandydata, za treściwe, ale i trafne podsumowanie kontekstu prac badawczych w rozdziałach II.3-II.5, oraz za implementację złożonych metod badawczych do rozwijających się zagadnień identyfikacji i pochodzenia surowców konopnych. Autor wykazał, że metoda GC-MS prowadzona z nastrożeniem cieplym pozyskanych olejków eterycznych i mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME) jest dobrym narzędziem analizy związków lotnych obecnych w kwiatostanach i liściach konopi siewnych, a suszenie tego materiału roślinnego ma duży wpływ na skład jakościowy i ilościowy oznaczanych związków lotnych. Ponadto Kandydat wykazał, że sposób suszenia nie wpływa na zawartość odzyskiwanych w analizie fitokannabinoidów i steroli, oraz na dekarboksylację form kwasowych kannabinoidów, a proces ekstrakcji i bielenia nie wpływa na skład fitosteroidów frakcji lipidowej, przynajmniej w wybranych przypadkach. Nie udało się Kandydatowi skutecznie zastosować technik NMR i genetycznych (STR) do badań identyfikacyjnych, ale należy uznać za dobry krok pochylenie się nad możliwościami aplikacyjnymi tych metod i wskazanie na ich aktualnie niewielką użyteczność, z perspektywą wykorzystania w przyszłości.

Na podstawie dostarczonych mi dokumentów stwierdzam, że Pan mgr inż. Andrzej Kwaśnica spełnił wymagania wynikające z przepisów Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce, w szczególności artykułu 186, punkty 1.1) – 1.3), oraz artykułu 187 punkty 1-4, i wnioskuję o dopuszczenie Pana mgr inż. Andrzeja Kwaśnicy do dalszych etapów procedury nadawania stopnia doktora. Jednocześnie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej ze względu na wagę poruszanych problemów, wysoki poziom zaproponowanego rozwiązania naukowego i technicznego, a także fakt wdrożenia protokołów badawczych do praktyki usługowej.

Prof. dr hab. Witold Musiał

