

Prof. dr hab. Jan Cz. Dobrowolski  
Instytut Chemii i Techniki Jądrowej, Warszawa  
Narodowy Instytut Leków, Warszawa

Warszawa, 9 stycznia 2019 r.

## Recenzja

pracy doktorskiej mgr inż. Magdaleny Reder pt. **Przydatność spektroskopii w średniej podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-MIR) do szybkiej, wieloelementowej oceny wybranych olejów jadalnych po smażeniu produktów spożywczych**, wykonanej w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie i promowanej przez Pana dr hab. Piotra Koczonía.

### 1. Znaczenie podjętego zagadnienia

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Magdaleny Reder dotyczy usprawnienia analizy i oceny jakości olejów jadalnych po smażeniu. Podstawą badań są pomiary metodą spektroskopii w podczerwieni (IR) poddane analizie chemometrycznej. Jest to zagadnienie ważne dla rozwoju analitycznych zastosowań spektroskopii IR w Chemii Żywności. Ma ono duże znaczenie także z powodu wpływu spożywanych tłuszczów jadalnych na zdrowotność społeczeństwa i ze względu na duże znaczenie gospodarcze olejów jadalnych.

Do analizy olejów jadalnych stosuje się wiele czasochłonnych technik instrumentalnych. Część z nich nie daje wglądu w strukturę molekularną. Inne zaś wymagają kosztownej aparatury. Zastosowanie analizy IR może być rozwiązaniem uniwersalnym. Rejestracja widma FTIR trwa kilka minut i wymaga ok. 3 mg oleju. Widmo zaś odzwierciedla strukturę badanych związków. Spektrometry FTIR są powszechnie dostępne, a producenci wkładają ogromny wysiłek w miniaturyzację, obniżenie cen i upowszechnienie aparatów przenośnych.

Skład spożywanych olejów i tłuszczów wpływa na zdrowotność ludzi. Dieta bogata w tłuszcze nasycone i izomery *trans* sprzyja rozwojowi chorób układu naczyniowo-sercowego, nadwadze, cukrzycy i chorobom neurodegeneracyjnym, zaś bogata w nienasycone kwasy tłuszczowe obniża to ryzyko.

Oleje i tłuszcze jadalne mają duże znaczenie dla gospodarki. Szacowana wartość światowego rynku olejów jadalnych i tłuszczów w roku 2017 to ok. 90 mld dolarów, a skumulowany roczny wskaźnik wzrostu tego rynku w najbliższych 5. latach wynosi 7.4%. Wobec tego poszukiwanie skuteczniejszych metod analizy i oceny jakości olejów jadalnych może mieć znaczenie dla tego ważnego działu gospodarki.

W ostatnich 40. latach badaniom olejów i tłuszczów jadalnych metodami IR, NIR i Ramana poświęcono ponad 200 publikacji. Metody te mają zalety w analizie układów niewodnych, a postęp aparaturowy i rozwój technik chemometrycznych zwiększył ich wiarygodność. Jednak wśród tych 200. prac tylko ok. 10 poświęcone było olejom poddanym wysokiej temperaturze, w tym 3 opublikowano w roku 2017 i 2018. Temat rozprawy został więc wybrany właściwie i dobrze wpisuje się w bieżące kierunki badań. Miejsce jego realizacji gwarantuje zaś osadzenie wyników w realiach potrzeb polskiego rynku.



## 2. Szczegółowe komentarze dotyczące pracy doktorskiej

Praca jest podzielona na dwie części A i B - pierwsza to *Praca doktorska*, a druga to *Wykaz dorobku naukowego*. Praca doktorska dzieli się na: *Wstęp*, *Przegląd literatury*, *Cel i zakres pracy*, *Metodykę pracy*, *Omówienie i dyskusję wyników*, *Podsumowanie i wnioski*, *Spis literatury*, *Spis tabel*, *Spis rysunków* oraz *Aneks*. *Wykaz skrótów i symboli używanych w pracy* jest przed *Spisem treści*. Praca jest zwięzła - zajmuje 133 strony, zawiera 104 odnośniki, a ok. 20 tabel jest w *Aneksie*.

W *Przeglądzie literatury* na 36. stronach opisana jest *Charakterystyka olejów smażalniczych stosowanych w Polsce*; *Zmiany chemiczne zachodzące w olejach podczas smażenia*; *Metody oznaczania parametrów świadczących o jakości olejów roślinnych używanych w trakcie smażenia*; *Spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera*; *Metody wykorzystywane w modelowaniu statystycznym i analizie chemometrycznej widm*.

W *Przeglądzie* są pewne niezręczności i błędy. W Tabeli 3 Doktorantka podaje 5 metod oznaczania WKT, lecz komórki kolumny *Parametry Statystyczne* zawierają niejednolite cechy, toteż typów oznaczeń dobrze porównać nie można. W tej tabeli Autorka używa synonimicznych wyrażen "granica oznaczalności", "limit detekcji" oraz "limit oznaczalności" i brakuje jedynie "granicy detekcji". Sugeruję stosowanie określeń zalecanych przez PTChem i IUPAC. Dlatego w definicji liczby nadtlenkowej warto byłoby zastąpić "milorównoważnik" molem.

Na stronie 34. Pani Reder definiuje drganie normalne pomijając konieczny warunek nieruchomego środka masy molekuly. W drganiach charakterystycznych grup funkcyjnych ruch atomów także odbywa się w fazie z jednakową częstością, lecz ignorujemy położenie środka masy i drgań tych nie nazywamy normalnymi. Zdziwiło mnie, że we wzmiance o spektrometrach z transformacją Fouriera (str. 36/37) nie ma mowy o samej transformacji. Z drugiej strony jednak wiem, że transformacja ta należy do działu matematyki, którego większość z nas nie zna.

Na str. 37 czytamy "*Pasma harmoniczne są słabe i często nakładają się na siebie co znacznie utrudnia interpretację widma w bliskiej podczerwieni...*". Myślę, że to przejęzyczenie i chodziło o nadtony i pasma kombinacyjne. Doświadczalne częstości są anharmoniczne, a harmoniczne wyznacza się z obliczeń kwantowo-mechanicznych. W w/w zdaniu Autorka odsyła nas też do rys. 7. zamiast 14.

Niepoprawnie brzmi kilkakrotnie użyte wyrażenie: "*drżania ... generują pasmo*" (np. str. 40). Pasma powstaje w wyniku absorpcji promieniowania przez molekulę podczas danego drżania. Zatem to nie drżania je "*wytwarzają*", choć w "*wytwarzaniu*" uczestniczą. Dziwnie brzmią też stwierdzenia "*pasmo przy częstości około 1238 cm<sup>-1</sup>*" (np. str. 40). Sugerują one, że mierzy się z dokładnością poniżej 1 cm<sup>-1</sup>. Tu powinno się napisać albo "*przy 1238 cm<sup>-1</sup>*", albo "*przy około 1240 cm<sup>-1</sup>*", albo liczbę zaokrąglić nawet do 1250. Innym nienajlepszym określeniem jest "*linia bazowa*" (np. str. 46). Pani Prof. Świętosławska od lat 50. opisywała różnego rodzaju korekty "*linii podstawowej*" po angielsku zwane, "*baseline correction*". Podobnie wyrażenie "*korekcja offset*" (str. 47) brzmi dziwnie. Chodzi przecież o zwykłe przesunięcie widma wzdłuż osi OY, które Doktorantka opisała tak, jakby Y było transmitancją. Tymczasem musi być absorbancją potem znów przekształconą do transmitancji. Także sformułowanie "*Multiplikatywna korekcja sygnału*" (str. 47) jest cudaczne. Dlaczego mnożenie nazywać multiplikacją? Operacja jest prosta. Należy pomnożyć widmo (sygnał), aby serię różnych pomiarów znormalizować i



móc porównywać. Wreszcie moim zdaniem opis metod chemometrycznych został zbyt wiernie wzorowany na oryginalnej pracy Stanimirovej i wsp.

Mimo wymienionych usterek, uważam przedstawiony przegląd literatury za ciekawy. Osobie luźno związanej z Chemią Żywności jasno przybliżył temat rozprawy. Jeśli zaś chodzi o spektroskopię IR, to przyznaję, że w jednym wypadku musiałem zweryfikować swoją błędną opinię. Szczególnie ciekawa wydaje mi się Tabela 4 podsumowująca najważniejsze prace dotyczące tematu rozprawy wykonane techniką spektroskopii w średniej podczerwieni. Tabela ta mogła być inspiracją do napisania publikacji przeglądowej tego ważnego zagadnienia.

Opis wyników rozprawy zaczyna się podrozdziałem *Cel i zakres pracy* (str. 53). Wiem, że oprócz recenzentów mało kto czyta prace doktorskie, ale czy informowanie o celu pracy w jej połowie nie jest dziwacznym pomysłem? W *Celu* Autorka formułuje dwie naturalne hipotezy: 1. o istnieniu korelacji pomiędzy parametrami uzyskanymi z widm IR i z analiz wykonanych wg norm, oraz 2. o możliwości osiągnięcia porównywalnie dokładnych wyników.

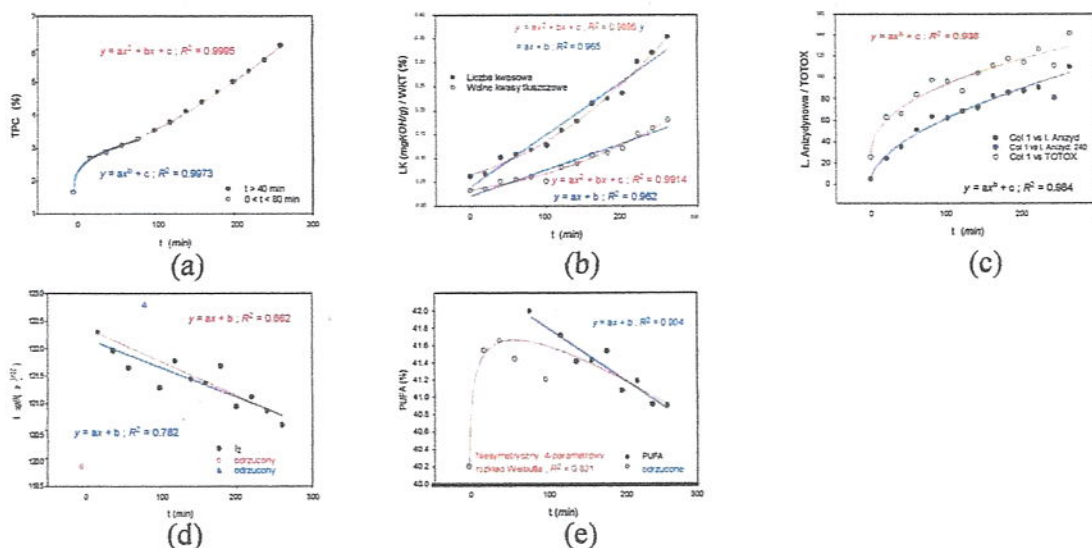
Weryfikacja hipotez opierała się na badaniach olejów rzepakowych i frytur, świeżych i po smażeniu. Za pomocą standardowych metod Pani Reder oznaczała skład kwasów tłuszczowych; liczby: kwasową, nadtlenkową, anizydynową, jodową; oraz współczynnik TOTOX i zawartość związków polarnych. (Dlaczego wśród tych parametrów nie ma zawartości izomerów *trans*?) Równolegle rejestrowała i analizowała widma IR tych samych próbek tworząc modele statystyczne analiz olejów na podstawie metod referencyjnych. Efektem tych badań była ocena możliwości zastosowania metody FT-IR do analiz olejów.

Podrozdział *Metodyka pracy* zawiera najniezbędniejsze informacje o stosowanych materiałach i metodach. Jestem zadowolony ze zwięzłości tej części. Jednak w wypadku metod statystycznych wolałbym uzyskać więcej informacji takich jak uzasadnienie wyboru metody PLS, czy testu Turkeya.

W *Omówieniu i dyskusji wyników* Pani Reder najpierw referuje zmiany parametrów olejów (w trakcie smażenia w przez 260 min) wyznaczone wg norm. Następnie bada liniowe korelacje tych parametrów z czasem smażenia. Korelacje ilustruje wykresami oraz dyskutuje w świetle bieżącej literatury. Wreszcie formułuje wnioski o wpływie smażenia na parametr. Taką drogę przyjmują też inni badacze zagadnienia. Istotnie Autorka otrzymuje raz silniejsze, a raz słabsze dopasowania niż literaturowe. Trzeba zatem stwierdzić, że wykonała tę część poprawnie. Jednak muszą też dodać, że można było ją zrobić lepiej.

Problem w tym, że na ogół liniowy model procesu jest statystycznie znacznie słabszy niż nieliniowy (Rys. 1a-1c). Ma to proste uzasadnienie chemiczne. Pani Reder podała je w *Przeglądzie literatury*. Podczas smażenia zachodzą złożone procesy odwadniania, utleniania, izomeryzacji i wiele innych. Mają one różne przebiegi w zależności od składu olejów, dostępności powietrza, temperatury, mieszania, dyfuzji, rozwinięcia powierzchni itd. Zatem najczęstsze wzorce zmian parametru to: (1) wzrost zakończony plateau; (2) wzrost do maksimum i spadek; (3) spadek od samego początku. Plateau występuje, jeśli składnik odpowiedzialny za wzrost się wyczerpał; spadek po maksimum - jeśli zachodzi reakcja następcza; a spadek od początku - jeśli zanika substancja obecna pierwotnie. Rzeczywistość jest oczywiście znacznie bardziej złożona i na ogół nie przewidywalna *a priori*. Wszystkie te procesy muszą być nieliniowe, bo zawsze któraś z substancji się wyczerpie. Szczęśliwie, na ogół długie fragmenty krzywych można doskonale interpolować prostymi. Dzięki temu można konstruować prostsze modele liniowe.





Rys. 1. Nieliniowe korelacje procesów badanych w doktoracie jako procesy liniowe

Dokonując analiz statystycznych nie można zbyt ufać programom komputerowym. Nawet jeśli istnieje korelacja liniowa, a w zbiorze punktów są odstające punkty, program potrafi błędnie orzec, że jej brak. Tak się właśnie stało w wypadku liczby jodowej. Autorka pisze (str. 69): "Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy liczbami jodowymi próbek pobranych w różnym czasie smażenia co oznacza, że liczba jodowa smażonego oleju nie zmieniała się w trakcie obróbki termicznej. Odmiennie wyniki uzyskali Choudhary i wsp. [2015], stwierdzili oni spadek liczby jodowej podczas 15 minutowego smażenia produktów warzywnych." W istocie wyniki są zgodne z literaturą, jeśli odrzuci się jeden lub dwa punkty (Rys. 1d). Słabe korelacje liniowe ( $R^2=0.662$  i  $R^2=0.782$ ) są zapewne i tak lepsze od literaturowych, gdzie podano jedynie %. spadek po smażeniu. Do ustalenia, czy punkty trzeba odrzucić służą np. testy Dixona i Grubbsa. Zatem należy zweryfikować wniosek, że "Uzyskane wyniki mogą świadczyć o dużej odporności oleju typu frytura badanego w niniejszej pracy na zmiany chemiczne podczas smażenia." Trudniejszy przykład stanowi liczba nadtlenkowa, o której na str. 67 Autorka pisze "Nie znaleziono korelacji pomiędzy czasem smażenia a liczbą nadtlenkową badanych próbek". Można się z nią zgodzić, ale można też dyskutować (Rys. 1e).

Procesy badane metodami standardowymi Pani Reder badała następnie metodą spektroskopii IR. Założenie liniowości obserwowanych zjawisk ma tutaj te same konsekwencje. Sprawdzenie zostawiam Doktorantce. O wyznaczeniu zawartości związków polarnych Autorka pisze tak (str. 71): "W pracy opisano jedynie te modele, w których uzyskano współczynniki determinacji powyżej 0,8." Dobrze, bo ponowna analiza danych pod kątem istnienia korelacji nieliniowych może wzmocnić już opisane korelacje i ujawnić cenne lecz odrzucone rezultaty.

Doktorantka wielokrotnie pokazuje, że modele PLS oparte na pierwszej pochodnej są zawsze słabsze. Cóż, analiza taka jest wymagająca. Choć usuwa się wpływ liniowego tła to zwiększają się szумы. Czasami lepiej jest polegać na drugiej pochodnej widm, tak jak zrobił to cytowany Ten i wsp. Ekstrema drugiej pochodnej występują blisko maksimum pasm IR. Usuwane jest tło lokalnie paraboliczne, choć szумы rosną jeszcze bardziej. Na pewno należy sprawdzić, czy wybrane zakresy widm wyjściowych są nadal właściwe przy pochodnych.



Mój niepokój wzbudziła liczba punktów walidacyjnych 3 oraz 4 zbiorów A i B - świeżych olejów rzepakowych oraz olejów typu frytura po smażeniu frytek. Zwykle unikamy tak małych próbek, bo niepewność przewidywań bardzo wzrasta. Zdałem sobie jednak sprawę, że być może trudno było zgromadzić większy zbiór próbek, a przy niewielkich liczbach olejów to program do analizy PLS określił liczby punktów kalibracyjnych i walidacyjnych. Jednak mimo to prosiłbym Doktorantkę o komentarz do tej uwagi.

Mimo moich wątpliwości co do obranej drogi postępowania, Pani Reder wykazała, że na podstawie pomiarów IR można szybko i wiarygodnie oznaczyć wiele ważnych parametrów jakości olejów posmażalniczych. Tym samym potwierdziła ona postawione hipotezy. Przekonująco wykazała, że dzięki metodzie częściowych najmniejszych kwadratów zastosowanej do widm IR uzyskuje się dobre korelacje z parametrami fizyko-chemicznymi olejów uzyskanymi wg norm. Zatem za pomocą analizy IR można oznaczać parametry olejów równie dokładnie. Jest to wynik konsekwentnego stosowania modelu liniowego zarówno w analizach referencyjnych i analizach metodą spektrometrii IR. Mimo iż model liniowy najczęściej nie jest optymalny i sprawdza się dobrze w ograniczonym zakresie czasów pomiarowych, to jednak identyczna metodologia analiz testowanych i referencyjnych sprawiła, że Doktorantka wykazała zgodność metod i możliwość uzyskania porównywalnej jakości wyników.

### 3. Inne uwagi

W moim odczuciu redakcja rozprawy nie jest staranna.

1. Dość często po kropce zdanie zaczyna się małą literą.
2. Na stronie 34. po raz pierwszy pojawia się określenie "*pasma na widmie*", tak jakby widmo było obrazem "*na*" którym znajduje się pasmo. Tymczasem widmo to zjawisko, na które składają się pasma "*w*" nim występujące. W klasycznym podręczniku Profesora Kęckiego "*Podstawy Spektroskopii Molekularnej*" występuje wyłącznie wyrażenie "*w widmie*". Także w "*Korpusie języka polskiego*" wyrażenie "*w widmie*" występuje dwudziestośmiokrotnie zaś "*na widmie*" jedynie trzykrotnie i w kontekście nie związanym ze spektroskopią.
3. Autorka pisze o teście Turkey'a zamiast Turkeya. Według *Wielkiego Słownika Języka Polskiego PWN* nazwiska kończące się na -y po samogłosce, takie jak Disney, otrzymują końcówki polskie bez apostrofu.
4. Doktorantka wiele podpisów formułuje następująco "*Determinacja liczby kwasowej świeżych ...*" "*Determinacja zawartości wolnych ...*". Angielskie "*determination*" to polskie "*oznaczenie*".
5. Pani Reder często używa wyrażeń "*relatywny błąd*", "*relatywne błędy*", które powinna zastąpić polskimi terminami "*błąd względny*", "*błędy względne*".
6. Odchylenie (np. standardowe) to nie "*deviance*" lecz "*deviation*".

#### 4. Podsumowanie

Przedstawiona rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Reder pt. **Przydatność spektroskopii w średniej podczerwieni z transformacją Fouriera (FT-MIR) do szybkiej, wieloelementowej oceny wybranych olejów jadalnych po smażeniu produktów spożywczych**, wykonana w Katedrze Chemii Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie i promowana przez Pana dr hab. Piotra Koczonias, wnosi elementy nowości do badań jakości olejów jadalnych metodą spektroskopii w podczerwieni wspartej metodami chemometrycznymi. W wyniku swoich badań Pani mgr inż. Magdalena Reder wykazała, że możliwe jest oznaczanie ważnych składników olejów jadalnych metodą IR z dokładnością porównywalną z oznaczeniami wg norm. Analizy Pani Reder są jednak szybsze i pozwalają oznaczać wiele składników naraz. Jak pokazałem w recenzji istnieje możliwość udokładnienia metody i uzyskania wyników wyraźnie lepszych niż literaturowe. Dlatego sądzę, że opracowane przez Doktorantkę metody analityczne mogą w przyszłości zastąpić kosztowniejsze i bardziej czasochłonne oznaczenia produktów degradacji olejów jadalnych po smażeniu. Sądzę, że ze względu na znaczenie olejów jadalnych badania Pani mgr inż. Magdaleny Reder mogą mieć istotne implikacje dla zdrowia publicznego i gospodarki kraju.

Doktorantka jest współautorką 4. publikacji w czasopismach z listy *Science Citation Index* o łącznym czynniku wpływu  $IF > 7$ . Jest też autorką 9. publikacji w czasopismach punktowanych przez MNiSzW. Mgr inż. Reder jest też współautorką 21. doniesień uwzględnionych w materiałach konferencyjnych. Odbyła dwutygodniowy staż na uniwersytecie w Isparcie w Turcji, a także uczestniczyła w Programie *TransFormation* w Lund w Szwecji. Wykazała się dużą aktywnością naukową. Realizuje nie tylko zadania związane z tematyką doktoratu, ale i z szeroko rozumianym zastosowaniem metod spektroskopii IR w Chemii Żywności.

W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska mgr inż. Magdaleny Reder spełnia warunki Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. **Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce** (Dz. U. 30 sierpnia 2018 r., poz.11668). Wnoszę więc o dopuszczenie mgr inż. Magdaleny Reder do następných etapów przewodu doktorskiego.



Jan Cz. Dobrowolski