



**Uniwersytet
Pomorski
w Słupsku**

Prof. dr hab. inż. Aleksander Astel
Zakład Chemii i Toksykologii Środowiska
Instytut Geografii
Uniwersytet Pomorski w Słupsku
ul. Arciszewskiego 22a, 76-200 Słupsk
tel. (+48 59) 8405-423,
e-mail: aleksander.astel@upsl.edu.pl

Słupsk, 28 czerwca 2025 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pacyńskiej "Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości leków w produktach żywnościowych wraz z ich walidacją i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu"

Niniejszą recenzję sporządziłem na podstawie decyzji Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, która na posiedzeniu w dniu 25.04.2025 r. powołała mnie na recenzenta.

1. Przedmiot recenzji

Przedmiotem recenzji jest rozprawa doktorska mgr Joanny Pacyńskiej "Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości leków w produktach żywnościowych wraz z ich walidacją i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu" ubiegającej się o stopień doktora nauk chemicznych przed Radą Naukową Dyscypliny Nauki Chemiczne UAM w Poznaniu. Promotorem rozprawy jest prof. dr hab. Przemysław Niedzielski a sama rozprawa ma charakter tzw. doktoratu wdrożeniowego.

2. Ocena merytoryczna rozprawy doktorskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska ma klasyczną formę monografii i zawiera 242 strony maszynopisu oraz dodatkowo Spis ilustracji, tabel, wykresów i aneks, w którym przedstawiono szczegółowe wyniki oznaczeń uzyskane w eksperymentach opisanych w rozprawie. Podstawową część rozprawy rozpoczyna Wykaz stosowanych skrótów i symboli. Kolejne elementy opisu merytorycznego autorka zestawiała w sposób klasyczny rozpoczynając opis od wstępu, przedstawienia budowy chemicznej i roli antybiotyków, które będą podstawą oznaczania, metod ekstrakcji, oczyszczania i technik analizy antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego. Pomiędzy częścią merytoryczną a doświadczalną, autorka umieściła rozdział, w którym zdefiniowano cel pracy a następnie płynnie przeszła do prezentacji części doświadczalnej, walidacji opracowanych procedur badawczych, opisu wdrożenia opracowanych procedur badawczych i rozdziału zawierającego wyniki badań rutynowych próbek rzeczywistych, które wykonano w okresie 2020-2024. Całość kończy podsumowanie,

streszczenia w języku polskim i angielskim oraz imponujący spis literatury, który obejmuje 224 pozycje. Forma, sekwencja rozdziałów i edycja rozprawy wskazują na to, że doktorantka dołożyła wszelkich starań, aby treść rozprawy była przemyślana, konsekwentna i logiczna. Bardzo pozytywnie należy ocenić poziom edycji tekstu, gdyż poza kilkoma literówkami lektura tekstu nie dostarcza wrażenia o braku spójności poszczególnych jej elementów. Lekki dyskomfort wywołuje sposób edycji wykazu stosowanych skrótów i symboli gdyż przy tak obszernym zestawieniu ułożenie alfabetyczne byłoby dobrą praktyką i znacznie przyspieszyło odszukanie pożądanego skrótu. W mojej ocenie, rozbudowany opis stosowanych w literaturze technik ekstrakcji można było także przygotować w nieco bardziej kompaktowej formie tabelarycznej, często spotykanej w pracach przeglądowych. Pozytywnie oceniam umieszczenie w rozprawie bardzo szczegółowych opisów metodyk przygotowania próbek stosowanych kolumn chromatograficznych, faz ruchomych i sprzętu analitycznego w odniesieniu do oznaczeń wybranych antybiotyków w matrycach będących obiektem zainteresowania doktorantki (Tabela 5).

Tematyka rozprawy jest ze wszechmiar aktualna. W chwili obecnej do środowiska wprowadza się dziesiątki tysięcy związków chemicznych w wyniku różnorodnej aktywności człowieka. Część z nich, po uzyskaniu pożądanego efektu pierwotnego zastosowania może ulegać degradacji, metabolizowaniu w organizmach lub transformacji. Szczególnie istotnym aspektem, związanym z rosnącym zapotrzebowaniem na produkty żywnościowe, jest konieczność stosowania szerokiego spektrum antybiotyków celem ochrony zwierząt hodowlanych. Niestety, nie wszystkie substancje podawane zwierzętom hodowlanym ulegają metabolizowaniu przed dostarczeniem wytworzonego z nich produktu żywnościowego na rynek. Pozostałości antybiotyków w produktach zwierzęcych mogą wywoływać niekorzystny, długofalowy wpływ na zdrowie ludzi, w tym powodować reakcje alergiczne i wywoływać działanie mutagenne i kancerogenne. Dlatego też istnieje pilna potrzeba kontrolowania poziomu stężenia pozostałości antybiotyków, ale również innych substancji, w produktach żywnościowych wykorzystując precyzyjne i zwalidowane metodyki analityczne. W konsekwencji, za główne cele rozprawy doktorskiej uznano opracowanie i wdrożenie procedur oznaczania pozostałości antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Docelowo, opracowane metody miały pozwalać na oznaczanie antybiotyków z różnych grup chemicznych takich jak tetracykliny, linkozamidy, amino glikozydy, fluorochinolony, sulfonamidy, β -laktamy, makrolity, pleuromutyliny i diaminopirydyminy w kluczowych matrycach wyjściowych do produkcji produktów żywnościowych: mięśniach, nerkach, mleku, miodzie i jajach, przy czym niektóre związki docelowo miały być oznaczane we wszystkich matrycach, zaś część z nich jedynie w wybranych. Celami pobocznymi, niezbędnymi do osiągnięcia celu strategicznego rozprawy, było dobranie technik ekstrakcji antybiotyków, które zapewnią skuteczną separację, minimalizację efektu matrycy i uzyskanie odpowiedniej czułości oznaczeń. Na etapie walidacji i wdrożenia opracowanych procedur niezbędne było dokonanie oceny szeregu kluczowych parametrów walidacyjnych (m.in. decyzyjna wartość graniczna, zdolność do wykrywania w badaniach przesiewowych, powtarzalność, odtwarzalność, odporność metody, odzysk, efekt matrycy i wyznaczenie niepewności pomiarowej). Ze względu na wdrożeniowy charakter rozprawy ostatnim elementem było zastosowanie opracowanych procedur analitycznych w akredytowanym laboratorium

weterynaryjnym po skutecznej akredytacji Polskiego Centrum Akredytacji w oparciu o szereg normowanych etapów audytowania.

Poszczególne elementy rozprawy, szczególnie opis części doświadczalnej niezbiecie dowodzi, że testowanie i późniejsze wdrożenie opracowanych metod oznaczania przeprowadzono sumiennie i prawidłowo. W opisie wykorzystanego sprzętu i wyposażenia laboratoryjnego doktorantka mogła, w analogii do konwencji artykułów naukowych, wskazać kraj pochodzenia dostawcy sprzętu, ale brak tych informacji należy potraktować jedynie jako drobne niedopatrzenie.

W procedurze dedykowanej oznaczaniu pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas zastosowano odrębne podejścia ekstrakcyjne, dostosowanych do właściwości chemicznych poszczególnych grup antybiotyków. Chociaż sposób przygotowania roztworów wzorcowych do wzbogacenia próbek, opis warunków przygotowania i przechowywania próbek do badań, sposób przygotowania próbek matrycowych wskazuje na bezdyskusyjnie poprawne podejście analityczne w tekście rozprawy niektórych elementów nie wyeksponowano, w mojej opinii, wystarczająco wyraźnie. Przykładowo, nie przedstawiono dostatecznie jednoznacznej argumentacji, dlaczego w procedurach ekstrakcyjnych dotyczących tkanek zwierzęcych od razu zdecydowano się na acetonitryl i kwas trichlorooctowy? Czy testowano, chociaż wstępnie, inne podejścia opisane w części literaturowej? Czy przy wyborze wspomnianych odczynników zastosowano metodologię zielonej chemii? Podobne pytania nasuwają się po lekturze opisywanych w analogiczny sposób procedur badawczych do oznaczania leków przeciwbakteryjnych w jajach i miodach. Zdecydowanie pozytywnie należy ocenić powtarzalny i precyzyjny opis metod oczyszczania próbek i ich przygotowania do analizy LC-MS/MS, optymalizacji warunków rozdzielania i ocenę skuteczności metod, które testowano w oparciu o krzywe wzorcowe i przykładowe chromatogramy. Drobny dyskomfort pojawia się w momencie, gdy czytelnik poznaje wartości odzysków analitów przy wykorzystaniu rekomendowanych rozpuszczalników, których nie porównywano statystycznie, lecz jedynie wizualnie na podstawie odpowiednich wykresów czy też analizy wartości liczbowych. W mojej ocenie, zastosowanie najprostszych testów nieparametrycznych do oceny różnic wartości średnich lub median odzysku wzbogaciłoby element prowadzonego w tym miejscu wywodu naukowego. Dodatkowo zakładam, że średnie wartości odzysku wyznaczono w oparciu o wartości uzyskane dla kilku powtórzeń dla tej samej próbki, więc uwzględnienie wartości odchyłeń standardowych serii pomiarowych na wykresach byłoby wskazane. Niemniej jednak, całość wywodu naukowego przedstawionego w rozdziałach poświęconych opisowi elementów składowych procedur badawczych oznaczania pozostałości antybiotyków w tkankach zwierzęcych, produktach spożywczych, miodach i jajach dowodzi fakt, że doktorantka nie tylko opanowała w wysokim stopniu warsztat analityczny lecz także cechuje ją zdolność bardzo precyzyjnego opisywania niuansów metodologicznych. Należy podkreślić, że przedstawiony opis jest klarowny, zrozumiały i merytorycznie spójny. Dowodów potwierdzających właściwy dobór wszelkich elementów procedur analitycznych dostarcza analiza parametrów walidacyjnych procedur, która nie pozostawia najmniejszej wątpliwości o przydatności zaproponowanych podejść w badaniach rutynowych.

W efekcie precyzyjnie zaplanowanych działań opracowano procedury badawcze oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach, mleku, nerkach, jajach i miodach z zastosowaniem zróżnicowanych protokołów ekstrakcyjnych dla poszczególnych grup związków, dla wszystkich rodzajów próbek przeprowadzono optymalizację warunków rozdzielania LC-MS/MS, potwierdzono liniowość zaproponowanych metod jak również poprawność opracowanych warunków analitycznych oraz ich przydatność do oznaczania szerokiego zakresu antybiotyków w różnych matrycach żywnościowych, przeprowadzono pełną walidację procedur i wdrożono je do rutynowych analiz.

Ze względu na niewielką ilość wątków dyskusyjnych przedstawionych powyżej (proszę o ustosunkowanie się do nich) możliwość dyskusji z doktorantką wykorzystam precyzując następujące pytania:

1. Jaka jest opinia doktorantki dotycząca bezpieczeństwa produktów żywnościowych będących przedmiotem rozprawy wprowadzanych do obrotu poza oficjalnymi kanałami dystrybucji?
2. Czy aktualne akty prawne, w których określono dopuszczalne poziomy MLR dla poszczególnych analitów spełniają swoje zadanie w świetle możliwych efektów toksycznych indukowanych, jako efekt współwystępowania analitów?

3. Wnioski końcowe

Podsumowując ocenę merytoryczną z całym przekonaniem pragnę stwierdzić, że doktorantka w pełni i konsekwentnie zrealizowała sprecyzowane cele badawcze jak również doprowadziła do wdrożenia opracowanych procedur w laboratorium. W mojej ocenie praca zawiera wiele elementów nowości, które stanowią znaczący wkład w rozwój dyscypliny nauki chemiczne, w szczególności zaliczam do nich gotowe i przetestowane procedury analityczne, które można zastosować nie tylko w laboratoriach weterynaryjnych, ale również w laboratoriach badawczo-rozwojowych. Precyzja opisów, ilość szczegółów metodologicznych i konsekwencja w prezentowaniu metodologii walidacji stanowią cenne źródło informacji i punkt wyjścia do dalszej optymalizacji metod i poszukiwania efektywnych technik oznaczania innych grup związków w analogicznych lub innych matrycach. Przedstawiona do recenzji rozprawa stanowi doskonały przewodnik metodyczny i dlatego, z całym przekonaniem uważam, że przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pt.: „Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości leków w produktach żywnościowych wraz z ich walidacją i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu” **spełnia warunki określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (tekst jednolity: Dz.U.2024.1571 ze zm.)** i wnoszę do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Chemiczne Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu o dopuszczenie mgr. Joanny Pacyńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.