



RPW/10272/2025 N
Data: 2025-06-05



Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska Polskiej Akademii Nauk

ul. M. Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 ZABRZE

tel.: (032) 271 64 81, fax.: (032) 271 74 70

e-mail: rajmund.michalski@ipispan.edu.pl

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Joanny Pacyńskiej p.t.: *„Opracowanie nowych procedur badawczych oznaczania pozostałości leków w produktach żywnościowych wraz z ich walidacją i wdrożeniem w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu”* przygotowanej w Wojewódzkim Inspektoracie Weterynarii w Poznaniu oraz na Wydziale Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza pod kierunkiem prof. dr hab. Przemysława Niedzielskiego.

1. Podstawowe dane o kandydatce

Recenzowana praca doktorska jest doktoratem wdrożeniowym. W związku z tym nieco inna jej specyfika oraz wymagania wobec doktorantki. Główny nacisk położony został na aspekty praktyczne. Pani mgr Joanna Pacyńska pracuje w Laboratorium Wojewódzkiego Inspektoratu Weterynarii w Poznaniu, a doktorat ten był realizowany od 2019 roku. Jest ona współautorką dwóch publikacji. Pierwsza to praca wieloautorska opublikowana w czasopiśmie *Reproductive Toxicology* (58 (2015) 54–60) zatytułowana *„Free-ranging domestic cats are characterized by increased metal content in reproductive tissues”*, a druga to opublikowana już po złożeniu doktoratu praca zatytułowana *„Scoping Review of Extraction Methods for Detecting β -Lactam Antibiotics in Food Products of Animal Origin”*, której współautorem jest prof. P. Niedzielski (*Molecules* 2025, 30(9), 1937).

Ponadto, co ważne w kontekście doktoratu wdrożeniowego doktorantka jest autorką 10 procedur badawczych, które zostały wdrożone w laboratorium w miejscu jej pracy. Procedury badawcze opisane w recenzowanym doktoracie podlegały pozytywnej akredytacji PCA i audytowi Komisji Europejskiej i są stosowane w nadzorze weterynaryjnym.

2. Wprowadzenie

Bezpieczeństwo żywności to bardzo ważny i aktualny temat, który jest przedmiotem licznych działań zarówno legislacyjnych, jak i badań naukowych. Wynika to z faktu, że obecność różnych substancji chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego wpływa bezpośrednio na nasze zdrowie. W hodowli zwierząt stosowane są leki, których pozostałości obecne w produktach spożywczych. Stosowanie antybiotyków w hodowli zwierząt jest niestety powszechne, w związku z czym ustanowiono normy określające ich maksymalne dopuszczalne zawartości w produktach spożywczych.

Niewłaściwe stosowanie antybiotyków może prowadzić do obecności ich pozostałości w żywności. Stanowi to zagrożenie dla zdrowia konsumentów i może przyczyniać się do rozwoju odporności bakterii. Dlatego pozostałości leków weterynaryjnych w żywności muszą być kontrolowane w ramach krajowych oraz unijnych programów monitorowania bezpieczeństwa żywności pochodzenia zwierzęcego. Wykrycie i potwierdzenie pozostałości danej substancji lub przekroczenie jej dopuszczalnej zawartości powinno powodować szybkie uruchomienie odpowiednich działań zapobiegawczych i administracyjnych.

Miarodajność uzyskiwanych wyników badań sprawdza się w ramach walidacji zoptymalizowanych metodyk pomiarowych zgodnie z wymogami normy EN/PN ISO 17025 oraz Rozporządzenia Wykonawczego Komisji (UE) 2021/808. Walidacja obejmuje szczegółową ocenę wybranych parametrów takich jak m.in. : decyzyjna wartość graniczna; zdolność wykrywania w badaniach przesiewowych; powtarzalność; odtwarzalność; odporność metody; odzysk; efekt matrycy i niepewność pomiaru. Do takich badań stosowane muszą być odpowiednio czułe, selektywne i dokładne metody i techniki analityczne. Szczególnie użyteczne w tym zakresie jest połączenie metod separacyjnych (głównie chromatografii cieczowej i jej odmian) z detekcją spektrometrii mas (w tym w układzie MS/MS). Takie techniki łączone są obecnie najbardziej miarodajnymi metodami pomiarowymi biorąc pod uwagę ich czułość, selektywność oraz wymagania jakie są stawiane w odpowiednich przepisach.

3. Przedmiot recenzji

Celem badań opisanych w rozprawie doktorskiej Pani Joanny Pacyńskiej było opracowanie i wdrożenie do praktyki laboratoryjnej miarodajnych procedur oznaczania wybranych pozostałości antybiotyków pochodzenia zwierzęcego. Opracowane procedury oparte o technikę łączoną LC-MS/MS miały na celu umożliwienie oznaczania wybranych antybiotyków, w tym takich jak: tetracykliny, β -laktamy (penicyliny i cefalosporyny), aminoglikozydy, czy sulfonamidy.

Ważnym etapem badań było dobranie odpowiednich technik ekstrakcji analitów, biorąc pod uwagę ich selektywność i wpływ złożonych matryc na jakość uzyskiwanych wyników. Przeprowadzona została optymalizacja warunków ekstrakcji dla każdej matrycy oraz parametrów pracy układu LC-MS/MS.

Doktorantka opracowała 3 procedury badawcze. Pierwsza o akronimie PBC-101.00.00 dotyczy oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w mięśniach, mleku oraz nerkach. Zastosowano w nich dwie opcje ekstrakcji analitów z próbek. Pierwsza z użyciem acetonitrylu oraz druga z zastosowaniem kwasu trichlorooctowego. Druga procedura badawcza (PBC-106.00.00) dotyczy oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w jajach. W tym przypadku zastosowano jedną opcję ekstrakcji dla wszystkich oznaczanych grup związków. Ostatnia trzecia procedura badawcza oznaczania pozostałości substancji przeciwbakteryjnych w miodach (PBC-25.00.00) oparta jest na dwóch wersjach ekstrakcji z zastosowaniem techniki SPE.

Dla wszystkich antybiotyków w każdej matrycy oceniono: selektywność, poprawność, powtarzalność, odtwarzalność, liniowość, efekt matrycy, odporność metody, a także wartości CC α oraz CC β . Wyznaczono także budżet niepewności. Wszystkie uzyskane podczas walidacji parametry spełniały wymagania zawarte w Rozporządzeniu Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808, co jest dowodem ich poprawności. Wartości odchylenia standardowego w

warunkach powtarzalności oraz odtwarzalności nie przekraczały 13% dla mięśni oraz mleka, 11% dla jaj oraz miodów oraz 10% dla nerek. Może to wydawać się sporo, ale jest to zgodne z dopuszczalnymi wartościami tego parametru dla danego rodzaju próbek.

Opracowane procedury badawcze poddano walidacji zgodnie z Rozporządzeniem Wykonawczym Komisji (UE) 2021/808 oraz z uwzględnieniem wymagań normy PN-EN ISO/IEC 17025. Ostatnim etapem było wdrożenie opracowanych zwalidowanych metodyk do systemu zarządzania jakością obowiązującego w Zakładzie Higieny Weterynaryjnej w Poznaniu. Po wdrożeniu procedur badawczych rozpoczęto rutynowe oznaczenia pozostałości antybiotyków w próbkach rzeczywistych dostarczanych do laboratorium. Badane były próbki urzędowe w ramach Krajowego Planu Monitoringowego, próbki z importu, próbki kierowane do badania potwierdzającego ilościowego po dodatnim wyniku badania jakościowego przeprowadzonego w Pracowni Badań Mikrobiologicznych w Poznaniu, a także próbki komercyjne. Probki monitoringowe pochodziły z województw północno-zachodniej Polski.

Uważam, że wszystkie etapy tych prac (optymalizacja metodyk, walidacja, wdrożenia) zostały przeprowadzone prawidłowo. Wskazuje to na bardzo dobre przygotowanie doktorantki, jej ogromne zaangażowanie oraz determinację w dążeniu do założonych celów.

4. Ocena układu rozprawy doktorskiej, w tym informacje o jej poszczególnych częściach składowych

Recenzowana praca składa się z 10 podstawowych części. Po krótkim wprowadzeniu w którym przedstawiono problem badawczy, doktorantka w rozdziale 2 opisała szczegółowo antybiotyki stosowane w hodowli zwierząt takie jak: β -laktamy; aminoglikozydy; makrolidy; sulfonamidy; chinolony (fluorochinolony); tetracykliny; linkozamidy; diaminopirymidyny i pleuromutyliny. Następnie w rozdziale 3 przedstawiła zagadnienia związane z pracami laboratoryjnymi i optymalizacją opracowywanych metodyk. Dotyczyły one: ekstrakcji, oczyszczania i technik analizy antybiotyków w żywności pochodzenia zwierzęcego w tym: ekstrakcji typu ciecz-ciecz; metodzie QuEChERS oraz ekstrakcji do fazy stałej, a także różnym technikom analitycznym stosowanych w analizie antybiotyków. Rozdział 4 to określenie celu prowadzonych badań, a w rozdział 5 dotyczy części doświadczalnej obejmującą m.in. stosowany sprzęt i wyposażenie laboratoryjne, odczynniki oraz wzorce antybiotyków.

W rozdziale tym opisano szczegółowo 3 procedury badawcze oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i produktach spożywczych metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas; procedurę badawczą oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w jajach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas oraz procedurę badawczą oznaczania pozostałości leków przeciwbakteryjnych w miodach metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Wszystkie procedury zawierają pełną dokumentację w postaci m.in. krzywych kalibracyjnych oraz chromatogramów.

W rozdziale 6 przedstawiono krok po kroku walidację opracowanych procedur obejmującą plan walidacji i założenia projektowe; liniowość; selektywność; precyzję, powtarzalność, odtwarzalność i poprawność oraz sposoby obliczania decyzyjnej wartości granicznej; zdolności wykrywania w badaniach przesiewowych oraz względny efekt matrycowy. Nie zapomniano także o wyznaczeniu innych parametrów walidacyjnych takich jak: odporność; stabilność i budżet niepewności. Rozdział 7 to wdrożenie opracowanych procedur badawczych, a rozdział 8 - badania rutynowe próbek rzeczywistych (tkanki

mięśniowej; mleka; jaj; miodów i nerek). Opracowanie kończą podsumowanie, streszczenie oraz bibliografia i spisy ilustracji, tabel, wykresów i dokumentów.

Po uważnym zapoznaniu się z recenzowaną pracą i poszukiwaniu nawet drobnych nieścisłości, „niestety” poza drobnymi „literówkami” nie znalazłem prawie nic. To „prawie” dotyczy opisanych przez doktorantkę skrótów:

IE – ang. Ion Exchange – sorbenty jonowymienne. Powinno być – wymiana jonowa.

HILIC – ang. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography – chromatografia cieczowa z interakcją hydrofilową. Powinno być: chromatografia oddziaływań hydrofilowych

Poniżej przedstawiam trzy pytania, które chciałbym zadać podczas publicznej obrony pracy doktorskiej:

- W jakim zakresie proponowane rozwiązania można będzie zastosować także do badań innych antybiotyków?
- Czy po kilku latach zastosowań opracowanych metodyk w praktyce laboratoryjnej może Pani powiedzieć coś o ich słabych stronach?
- Czy są znane Pani inne procedury badawcze stosowane w polskich laboratoriach dla tego samego zakresu analitów i matrycy?

5. Wniosek końcowy

Recenzowana praca doktorska Pani mgr Joanny Pacyńskiej jest bardzo dobrze przygotowana i napisana. Wszystkie kolejne jej etapy zostały jasno i logicznie opisane i w pełni udokumentowane. Stanowi ona oryginalne komercyjne rozwiązanie ważnego problemu oznaczania pozostałości antybiotyków w produktach zwierzęcych. Ma to szczególne znaczenie biorąc pod uwagę jej wdrożeniowy charakter. W takim przypadku istotny jest transfer wiedzy naukowej do praktyki. Opracowane przez doktorantkę metodyki zostały wdrożone do praktyki laboratoryjnej od kilku lat i przynoszą realne korzyści dla ich użytkowników.

Formalnie recenzowana praca nie spełnia wymogów jej wyróżnienia. Zgodnie z zarządzeniem nr/3/2021 Dziekana Wydziału Chemii UAM z dnia 21 czerwca 2021 w sprawie procedury wyróżniania rozpraw doktorskich na Wydziale Chemii UAM wyróżniona może być praca w której doktorantka ukończyła ją 5 lat od momentu rozpoczęcia studiów doktoranckich. Tak nie jest w tym przypadku, ale zgodnie z moją wiedzą opóźnienie wynikało zarówno z pandemii, jak i audytu Komisji Europejskiej w miejscu pracy doktorantki.

Tym niemniej biorąc pod uwagę jej całokształt, a w szczególności wdrożeniowy charakter wnioskuje o jej wyróżnienie. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że zrealizowała ona ambitny i rozbudowany program badawczy. Doktorantka przeprowadziła wiele czasochłonnych i szczegółowych badań i wykazała się dużą konsekwencją, dociekliwością i systematycznością. Wskazuje to na jej dużą wiedzę w dyscyplinie naukowej i umiejętność łączenia nauki z praktyką.

Uważam, że w świetle obowiązujących przepisów (art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 roku *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce* (Dz. U. z 2018 r. poz. 1688 z późniejszymi zmianami) przedstawiona praca doktorska mgr Joanny Pacyńskiej spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Dyscypliny Naukowej Nauki Chemiczne Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu o jego dopuszczenie do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Zabrze, dnia 3 czerwca 2025r.

Prof. dr hab. Rajmund Michalski

Instytut Podstaw Inżynierii Środowiska PAN, ul. M.Skłodowskiej-Curie 34, 41-819 Zabrze
rajmund.michalski@ipispan.edu.pl

