

# Autoreferat

dr n. wet. Kamila Mitrowska

Zakład Farmakologii i Toksykologii  
Państwowy Instytut Weterynaryjny  
- Państwowy Instytut Badawczy  
w Puławach



Puławy, 2015

## Spis treści

1. Imię i Nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.).....	3
4a) Tytuł osiągnięcia naukowego będącego jednotematycznym cyklem publikacji.....	3
4b) Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu.....	4
4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych .....	18
5a) Pozostały dorobek publikacyjny .....	18
5b) Udział w projektach badawczych .....	26
5c) Nagrody za działalność naukową.....	27
5d) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych .....	27
5e) Udział w komitetach naukowych i organizacyjnych konferencji naukowych.....	28
5f) Członkostwo w towarzystwach naukowych.....	28
5g) Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę .....	28
5h) Opieka naukowa w charakterze promotora pomocniczego .....	29
5i) Odbyte staże, szkolenia i kursy naukowe .....	29
5j) Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych .....	31
5k) Inna działalność.....	31

## 1. Imię i Nazwisko

Kamila Mitrowska

## 2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2006      Doktor nauk weterynaryjnych;
- Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB) w Puławach;
- Tytuł pracy doktorskiej: „Pozostałości zieleni malachitowej i jej metabolitów w tkankach ryb”;
- 2002      Magister analityki medycznej;
- Uniwersytet Jagielloński - Collegium Medicum, Wydział Farmaceutyczny, Oddział Analityki Medycznej w Krakowie;
- Tytuł pracy magisterskiej: „Badanie mechanizmów oporności wśród szczepów wybranych gatunków bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*”.

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 2008 - obecnie      Zakład Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach - adiunkt;
- 2006 - 2008      Zakład Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach - główny specjalista badawczo - techniczny;
- 2002 - 2006      Zakład Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB w Puławach - doktorant.
- Stáže zagraniczne:
- 2008 - 2010      Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów, Wspólnotowe Centrum Badawcze, Komisja Europejska (EC-JRC-IRMM) w Geel, Belgia - dwuletni staż podoktorski.

## 4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.)

### 4a) Tytuł osiągnięcia naukowego będącego jednotematycznym cyklem publikacji<sup>1</sup>

„Badanie występowania pozostałości 5-nitroimidazoli i ich metabolitów w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas”

<sup>1</sup> Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowią Załącznik 8 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

#### 4b) Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu

##### Praca przeglądowa stanowiąca wstęp:

**H1: Mitrowska K.** (2015) Przyczyny i skutki zakazu stosowania 5-nitroimidazoli u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi. *Medycyna weterynaryjna*. Praca zakwalifikowana do druku i dostępna na stronie: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.1396536>. (IF<sub>2013</sub> = 0,196; MNiSW<sub>2014</sub> = 15; Liczba cytowań = 0)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zebraniu i analizie piśmiennictwa, napisaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

##### Prace oryginalne:

**H2: Mitrowska K.,** Posyniak A., Zmudzki J. (2010) Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography mass spectrometry. *Talanta* 81, 1273-1280. (IF<sub>2010</sub> = 3,722; MNiSW<sub>2010</sub> = 32; Liczba cytowań = 17)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, przeprowadzeniu części oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

Praca ta uzyskała Nagrodę I-stopnia Dyrektora PIWet-PIB w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych w roku 2010 r.

**H3: Mitrowska K.,** Antczak M., Posyniak A. (2014) A confirmatory method for the determination of nitroimidazoles in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 581-587. (IF<sub>2013</sub> = 0,365; MNiSW<sub>2014</sub> = 15; Liczba cytowań = 0)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, przeprowadzeniu części oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

**H4: Mitrowska K.,** Posyniak A., Zmudzki J. (2014) Selective determination of fourteen nitroimidazoles in honey by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Letters* 47, 1634-1649. (IF<sub>2013</sub> = 1,019; MNiSW<sub>2014</sub> = 20; Liczba cytowań = 0)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, przeprowadzeniu części oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, wysłaniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

Badania przedstawione w tej pracy realizowane były w ramach naukowego projektu Nr IP2011 036571 Iuventus Plus: „Opracowanie warunków analizy pozostałości nitroimidazoli w miodzie” finansowanego przez MNiSW (2012-2014); kierownik: dr n. wet. Kamila Mitrowska.

**H5: Mitrowska K., Pekala A., Posyniak A. (2015) Tissue distribution and residue depletion of metronidazole in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Food Additives and Contaminants Part A-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 32, 841-848. (IF<sub>2013</sub> = 2,341; MNiSW<sub>2014</sub> = 30; Liczba cytowań = 0)**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, zaplanowaniu wszystkich doświadczeń, przeprowadzeniu części oznaczeń analitycznych, opracowaniu i interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu, wystąpieniu pracy do druku oraz wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

#### **Sumaryczna punktacja 5 publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe:**

- Współczynnik wpływu (IF)<sup>2</sup>: **7,643**;
- Liczba punktów wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW)<sup>3</sup>: **112**;
- Liczba cytowań<sup>4</sup>: **17**.

#### **4c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

##### **Wstęp**

Prowadzenie produkcji zwierzęcej opartej o intensywne metody żywienia i utrzymania wydaje się być prawie niemożliwe bez stosowania leków weterynaryjnych, którymi niemal rutynowo traktuje się zwierzęta w celach leczniczych. Nawet w najlepszych warunkach zarządzania, zgromadzenie dużej liczby zwierząt na ograniczonej powierzchni i związany z tym stres mogą obniżyć odporność immunologiczną zwierząt i doprowadzić do powstania choroby. Dzięki zastosowaniu leków weterynaryjnych uzyskuje się efekt terapeutyczny. Jednakże takie działanie wiąże się z możliwością występowania pozostałości substancji farmakologicznie aktywnych w jadalnych tkankach lub produktach zwierzęcych. Pozostałości te mogą toksycznie oddziaływać na konsumenta, wywierając mniej lub bardziej rozległe efekty uboczne od zaburzeń w prawidłowym funkcjonowaniu narządów wewnętrznych po działania mutagenne, kancerogenne czy też teratogenne.

Jedną z bardziej toksycznych grup leków stosowanych w medycynie weterynaryjnej są pochodne 5-nitroimidazoli. Substancje te są skutecznymi środkami wykorzystywanymi w leczeniu inwazji pierwotniaków oraz infekcji spowodowanych przez bakterie beztlenowe i w związku z tym do niedawna były szeroko stosowane w medycynie weterynaryjnej. Jednakże ze względu na potencjalne działanie genotoksyczne i kancerogenne ich użycie

<sup>2</sup> Wg listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania.

<sup>3</sup> Wg komunikatów MNiSW, zgodnie z rokiem opublikowania.

<sup>4</sup> Wg bazy Web of Science (WoS) z dnia 18.05.2015.

u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi zostało zabronione w wielu krajach. Obecnie niektóre substancje z grupy nitroimidazoli są dopuszczone do stosowania wyłącznie w leczeniu zwierząt towarzyszących oraz w medycynie człowieka, mimo iż przyczyną wycofania ich użycia w hodowli zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność była troska właśnie o zdrowie ludzi.

Do nitroimidazoli, które w przeszłości były zarejestrowane w Unii Europejskiej (UE) jako leki weterynaryjne lub dodatki paszowe stosowane u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność należą: metronidazol (MNZ), dimetridazol (DMZ), ronidazol (RNZ) i ipronidazol (IPZ). Leki z tej grupy dzięki niewątpliwym zaletom terapeutycznym miały zastosowanie w zwalczaniu dyzenterii u świń, w zatrzymaniu błon płodowych u krów oraz w zakażeniach powstałych w wyniku interwencji chirurgicznych. Ponadto były używane w leczeniu histomonadozy, trychomonadozy i giardiozy u drobiu, trychomonadozy u bydła [1, 2] oraz heksamitozy u ryb [3]. Natomiast zarejestrowany na terenie Rosji i Armenii preparat Nosemat, zawierający w swoim składzie metronidazol i oksytetracyklinę, zalecany jest w zwalczaniu nosemozy u pszczoły miodnej [4]. Nitroimidazole, stosowane jako dodatki do paszy, działały jako antybiotykowe stymulatory wzrostu, jednakże ich użycie w tym charakterze również zostało zabronione w UE [5-8].

Mechanizm działania nitroimidazoli związany jest z redukcją grupy nitrowej podstawionej w pozycji 5 pierścienia imidazolowego, czego następstwem jest powstawanie reaktywnych produktów pośrednich, które uszkodzają DNA komórek patogenu i prowadzą do ich śmierci. Oprócz działania przeciwbakteryjnego, mechanizm ten wyjaśnia także efekty mutagenne wywierane przez nitroimidazole.

Niewiele jest informacji dotyczących farmakokinetyki nitroimidazoli u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność, a te które są dostępne są mało aktualne i odnoszą się tylko do kur niosek, krów i owiec. Nitroimidazole są związkami słabo zasadowymi, umiarkowanie lipofilnymi o małej masie cząsteczkowej, dzięki czemu łatwo penetrują błony komórkowe i umożliwiają prawie całkowite wchłanianie do krążenia ogólnoustrojowego. Z przewodu pokarmowego są wchłaniane szybko, ale w różnym stopniu a następnie przechodzą do wszystkich tkanek. Nitroimidazole ulegają w wątrobie szybkiemu utlenianiu do hydroksy-, acetylo- i karboksypochoodnych, a dalej podlegają sprzęganiu z kwasem glukuronowym i siarkowym [7]. Na drodze utleniania z metronidazolu powstaje hydroksymetronidazol (MNZOH), z ipronidazolu tworzy się hydroksyipronidazol (IPZOH), a dimetridazol i ronidazol mają wspólny metabolit - 2-hydroksylmetyl-1-metyl-5-nitroimidazol (HMMNI) [9]. Wszystkie te hydroksymetabolity nadal posiadają w swojej strukturze pierścień imidazolowy, dlatego ich kancerogenność nie może być wykluczona [7, 10]. Zarówno substancje macierzyste nitroimidazoli, jak i ich hydroksymetabolity są wydalane z organizmu głównie z moczem, zaś w mniejszym stopniu z żółcią i kałem oraz przez płuca z wydychanym powietrzem [1, 2, 7].

Najbardziej istotny i kontrowersyjny aspekt toksyczności nitroimidazoli wiąże się z ich genotoksycznością. Na podstawie dostępnych danych naukowych metronidazol uznano za lek genotoksyczny dla ludzi po podaniu doustnym i nie wyklucza się, że pozostałe nitroimidazole mogą wywierać podobne działanie [10-12]. Ponadto metronidazol wykazuje działanie kancerogenne u zwierząt. Po długotrwałym podawaniu zaobserwowano

zwiększenie częstości występowania nowotworów gruczołu mlekowego, wątroby, przysadki i jąder u szczurów oraz chłoniaków złośliwych i gruczolaków płuc u myszy [10, 11]. W badaniach nad kancerogennością innych nitroimidazoli wykazano, że dimetridazol, ronidazol i ipronidazol zwiększają częstość powstawania nowotworów gruczołu mlekowego u szczurów, a ronidazol i ipronidazol dodatkowo indukują wzrost guzów płuc u myszy [11, 12]. Mimo że nie dowiedziono kancerogennego działania metronidazolu u ludzi, to mając na względzie fakt, że nie badano odległych skutków długotrwałej terapii dużymi dawkami tego leku Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zakwalifikowała w 1987 r. metronidazol do grupy 2B obejmującej substancje potencjalnie rakotwórcze dla człowieka [13].

Z powodu mutagennego i kancerogennego potencjału nitroimidazoli nie wyznaczono dopuszczalnego dziennego pobrania (ADI - *ang. acceptable daily intake*) ani najwyższego dopuszczalnego poziomu pozostałości (MRL - *ang. maximum residue limit*) i w konsekwencji stosowanie tych związków jest niedozwolone u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do spożycia przez ludzi.

Ze względu na brak wystarczających badań nad kancerogennością u ludzi oraz podejrzenie, że 5-nitroimidazole i ich metabolity występując w produktach spożywczych zwierzęcego pochodzenia mogą także niekorzystnie oddziaływać na zdrowie konsumentów, w 1993 r. wycofano w UE autoryzację dla ronidazolu [6], w 1995 r. dla dimetridazolu [5], a w 1998 r. dla metronidazolu [8] jako leku weterynaryjnego do stosowania u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. Natomiast jako dodatek paszowy ronidazol został wycofany w 1998 r. [14], ipronidazol w 1999 r. [15], a dimetridazol dopuszczony był do użytku tylko do 2002 r. [16]. Pozostałe nitroimidazole nigdy nie były zarejestrowane jako leki weterynaryjne do stosowania u zwierząt, których tkanki lub produkty przeznaczone są do konsumpcji. Wycofane nitroimidazole zostały umieszczone w Aneksie IV Rozporządzenia Rady (EWG) 2377/90 [17], która obecnie jest zastąpiona Rozporządzeniem Komisji (UE) 37/2010 [18], a substancje te ujęto w tabeli 2, w której zebrano substancje zakazane, dla których wartości MRL nie mogą być wyznaczone.

Skutkiem zakazu stosowania nitroimidazoli u zwierząt, z których lub od których pozyskuje się żywność jest obowiązek prowadzenia przez kraje UE i kraje do niej eksportujące żywność systematycznej kontroli pozostałości nitroimidazoli zgodnie z Dyrektywą Rady 96/23/WE [19], co przyczynia się do zapewnienia bezpieczeństwa i zmniejszenia ewentualnego zagrożenia dla zdrowia konsumenta. W wykazie substancji objętych programem kontroli pozostałości nitroimidazole znajdują się w grupie A6, w której umieszczone są substancje zakazane, w tym chloramfenikol, chloropromazyne i nitrofurany.

Pomimo wprowadzenia wyżej wymienionych regulacji, w wielu krajach eksportujących żywność do UE nadal stosuje się te zakazane leki u zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. Dotychczas pozostałości nitroimidazoli znajdowane były w brojlerach z Argentyny lub wołowinie z USA. Jednak ostatnie raporty Systemu Wczesnego Ostrzegania w Zakresie Żywności i Środków Żywności Zwierząt (RASFF) z 2011 r. pokazują, że substancje te mogą znajdować się również w miodzie sprowadzanym z Chin, Indii czy Gwatemali. Ponadto pozostałości tych związków znajdowane są w próbkach pobieranych w ramach programów badań kontrolnych pozostałości prowadzonych przez kraje UE.

W 2012 r. w UE w ramach programu kontroli pozostałości przebadano 427 193 próbek żywności i produktów pochodzenia zwierzęcego w kierunku obecności blisko 800 substancji niedozwolonych lub których stężenie nie powinno przekraczać wyznaczonych limitów. Spośród 1 071 wyników niezgodnych 8 wyników dotyczyło grupy nitroimidazoli co stanowiło 23% wszystkich niezgodnych wyników w grupie A6, w której znajdują się również inne substancje zakazane takie jak: chloramfenikol, chloropromazyna i nitrofurany. W latach 2002-2012 stwierdzono obecność nitroimidazoli łącznie w 66 próbkach. Najwięcej wyników niezgodnych dotyczyło metronidazolu obecnego w próbkach drobiu i świń oraz w jajach we Francji (25 wyniki) i Niemczech (15 wyników) [20-25]. Ostatnie doniesienia wykazały obecność tego leku również w mięśniach pstrąga tęczowego [26].

W związku z powyższym, mając na uwadze ochronę zdrowia konsumenta, istnieje potrzeba kontroli pozostałości nitroimidazoli w żywności pochodzenia zwierzęcego, a ta możliwa jest dzięki zastosowaniu odpowiednich, wysoce czułych i selektywnych procedur badawczych w odpowiednio dobranym i przechowywanym materiale biologicznym. Nitroimidazole jako leki zakazane nie powinny występować w żywności pochodzenia zwierzęcego w najmniejszym nawet stężeniu (tolerancja „zero”). Związki te nie mają jak dotąd wyznaczonego wymaganego minimalnego poziomu oznaczania (MRPL - *ang. minimum required performance limit*) dlatego Unijne Laboratorium Referencyjne (EURL) ds. nitroimidazoli w Berlinie wprowadziło „rekomendowane stężenie” oznaczania wszystkich nitroimidazoli i ich metabolitów na poziomie 3 µg/kg [27].

Dotychczas opublikowano kilka metod analitycznych, które umożliwiają oznaczenie pozostałości nitroimidazoli w tkankach zwierząt i ich produktach. Jednak postęp myśli analitycznej oraz coraz większe wymagania stawiane metodom stosowanym w analizie pozostałości substancji zakazanych, w tym nitroimidazoli, w żywności pochodzenia zwierzęcego sprawiają, że wciąż istnieje potrzeba tworzenia nowych procedur analitycznych.

Opracowywanie metod oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych i substancji zakazanych w tkankach i produktach zwierząt to wieloetapowy i złożony proces, który zazwyczaj obejmuje optymalizację etapu pobierania próbek, ekstrakcji analitu z próbki, oczyszczania otrzymanego ekstraktu oraz rozdziału i detekcji. Etap przygotowania próbki do analizy instrumentalnej jest często bardzo czasochłonny i może pochłaniać do 80% całkowitego czasu pełnej analizy. Ponadto, jakość przygotowania próbki jest kluczowym czynnikiem dokładności i wiarygodności otrzymywanego wyniku.

Obecny rozwój metod analitycznych stosowanych w oznaczaniu pozostałości obejmuje wykorzystanie chromatografii cieczowej (LC) lub gazowej (GC) połączonej z techniką spektrometrii mas (MS) zarówno w metodach przesiewowych jak i potwierdzających. Spektrometria mas ma przewagę nad dotychczas wykorzystywanymi detektorami absorpcji w ultrafiolecie (UV), z matrycą diodową (DAD) czy fluorescencyjnymi (FLD) i sprawdza się przy konieczności oznaczania wielu związków o różnych właściwościach fizykochemicznych oraz tam gdzie wymagane są bardzo niskie poziomy oznaczalności w bardzo złożonych matrycach biologicznych.



Ponadto Decyzja Komisji 2002/675/WE określa wymagania, jakim winny sprostać metody analityczne stosowane w badaniu substancji zakazanych lub oznaczaniu niedozwolonych stężeń leków weterynaryjnych [28]. Zgodnie z wytycznymi zawartymi w tej decyzji, do potwierdzania substancji zakazanych, w tym nitroimidazoli, powinno stosować się spektrometrię mas, która będąc techniką wysoce czułą i selektywną umożliwia jednoznaczny, na podstawie struktury chemicznej, identyfikację substancji w badanej próbce.

Według Decyzji Komisji 2002/657/WE metody ilościowe wykorzystywane w oficjalnej kontroli pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego powinny być zwalidowane a wyznaczone parametry takie jak: specyficzność, liniowość, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna, poprawność (odzysk), stabilność i odporność oraz limit decyzyjny ( $CC\alpha$ ) i zdolności wykrywania ( $CC\beta$ ) muszą spełniać odpowiednie kryteria. Obowiązująca w laboratoriach akredytowanych norma PN-EN ISO/IEC 17025 dodatkowo wprowadza obowiązek szacowania niepewności wyniku pomiaru [29]. Powyższe dokumenty mówią również o konieczności regularnego sprawdzania stosowanych procedur badawczych w porównaniach międzylaboratoryjnych i badaniach biegłości.

Szczegółowe informacje na temat farmakokinetyki, toksyczności oraz występowania pozostałości najczęściej stosowanych w medycynie weterynaryjnej nitroimidazoli zebrano w pracy przeglądowej **H1**.

### **Cel podjętych badań**

Celem podjętych badań było określenie występowania pozostałości 5-nitroimidazoli w żywności pochodzenia zwierzęcego, co zostało zrealizowane przez:

- opracowanie nowego podejścia analitycznego do oznaczania pozostałości 5-nitroimidazoli i ich metabolitów w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego, które sprostają międzynarodowym wymaganiom analitycznym;
- określenie rozmieszczenia, metabolizmu i czasu zanikania metronidazolu w tkankach i narządach pstrąga tęczowego.

### **Omówienie przeprowadzonych badań i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

#### ***Opracowanie nowego podejścia analitycznego do oznaczania pozostałości 5-nitroimidazoli i ich metabolitów w tkankach zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego, które sprostają międzynarodowym wymaganiom analitycznym***

Badania w kierunku pozostałości nitroimidazoli rozpoczęto w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB w latach 90. ubiegłego wieku [30]. Zakres analityczny obejmował z początku tylko dwa związki, tj. metronidazol i dimetridazol w mięśniach zwierząt. Następnie w 2004 r. dodano ronidazol i badania te wykonywane były z użyciem chromatografii cieczowej z detektorem UV lub DAD.

Wprowadzone w 2007 r. przez EURL ds. nitroimidazoli zalecenie by oprócz substancji macierzystych oznaczać również hydroksymetabolity nitroimidazoli na poziomie poniżej 3 µg/kg wymusiło zastosowanie spektrometrii mas nie tylko w metodzie potwierdzającej ale też i przesiewowej. Dodatkowo wskazano konieczność analizy osocza lub siatkówki oka u drobiu, gdyż stanowią one materiał bardziej homogeny i dostępny do pobrania, zaś anality występują w tych matrycach w wyższych stężeniach, utrzymują się dłużej i są bardziej stabilne niż w mięśniach [31]. Krajowy program badań kontrolnych pozostałości w Polsce obejmował wówczas analizę ponad 300 próbek różnego rodzaju, w tym: mięśnie i osocze bydła, świń, kurcząt, indyków, gęsi i kaczek oraz próbki mięśni owiec, kóz, ryb, królików i zwierząt dzikich utrzymywanych w warunkach fermowych, a także jaja [32].

Wymagania te były podstawą podjęcia prac badawczych nad opracowaniem nowej, doskonalszej metody analitycznej z wykorzystaniem spektrometrii mas. Przy tak szerokim zakresie matryc różnych gatunków zwierząt, które mają być analizowane w planie kontrolnym pozostałości w kierunku nitroimidazoli i ich metabolitów zaistniała potrzeba zastosowania takiej procedury analitycznej, która pozwoliłaby na oznaczanie tych związków w mięśniach, osoczu i jajach zwierząt różnego gatunku przy zastosowaniu jednego wspólnego protokołu przygotowania próbki.

Opublikowanych wówczas było tylko kilka procedur analitycznych z wykorzystaniem LC-MS lub GC-MS dla oznaczania nitroimidazoli w tkankach i produktach zwierząt. Zakres analityczny tych procedur ograniczał się jednak do kilku związków i ich metabolitów w jednej lub dwóch matrycach. Tylko jedna opublikowana metoda pozwalała na oznaczanie nitroimidazoli w większej liczbie matryc, tj. w mięśniach, wątrobie, osoczu i siatkówce oka przy zastosowaniu jednego wspólnego protokołu przygotowania próbki [31]. Metodyka ta nie obejmowała jednak swym zakresem analitycznym jaj i wykorzystywała technikę GC-MS, przy użyciu której nie było możliwe odróżnienie RNZ od HMMNI, dlatego podjęłam się opracowania nowego podejścia analitycznego do oznaczania pozostałości nitroimidazoli i ich metabolitów w mięśniach, osoczu i jajach z zastosowaniem LC-MS, które zostało przedstawione w pracy **H2**.

W wyniku przeprowadzonych badań opracowano nową, prostą i szybką metodę oznaczania MNZ, DMZ, RNZ, IPZ, MNZOH, HMMNI i IPZOH w mięśniach, osoczu i jajach drobiu. W badaniach wykorzystano tandemową spektrometrię mas (LC-MS/MS), a do zbierania danych w analizie ilościowej zastosowano monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji (MRM - *ang. multiple reaction monitoring*), co miało zapewnić wysoką czułość i selektywność analizy wynikającą z faktu, że reakcja fragmentacji łączy ze sobą dwie różne masy charakterystyczne dla badanego związku.

Badania rozpoczęto od ustalenia optymalnych warunków pracy tandemowego spektrometru mas z zastosowaniem pozytywnej jonizacji przez elektrorozpraszanie (ESI - *ang. electrospray ionisation*) poprzez dozowanie roztworu nitroimidazoli oraz ich deuterowanych pochodnych (służących jako wzorce wewnętrzne) do aparatu. W wyniku optymalizacji warunków detekcji dla każdego analitu wybrano jony macierzyste oraz jony fragmentacyjne przy określonej energii kolizji. Zoptymalizowano wartości parametrów pracy źródła jonów, tj. temperatury, natężenia przepływu gazu rozpylającego, osłonowego

i kolizyjnego, napięcia rozpylania oraz potencjału fragmentacyjnego i wejściowego. Dla oznaczania nitroimidazoli monitorowano jeden jon macierzysty i dwie wybrane reakcje fragmentacji, co spełniło podstawowe wymaganie dla metod potwierdzających według wprowadzonego przez Decyzję Komisji 2002/657/WE systemu punktów identyfikacyjnych. Dla każdego wzorca wewnętrznego monitorowano jeden jon macierzysty i jedną reakcję fragmentacji.

Następnie opracowano oryginalne warunki rozdziału chromatograficznego, który przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem oktadecylowym (C18) oraz fazy ruchomej składającej się z 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu i 0,1% roztworu kwasu mrówkowego w wodzie w warunkach elucji gradientowej.

Przy opracowywaniu wspólnego protokołu przygotowania próbek mięśni, osocza i jaj porównywano efektywność różnych sposobów izolacji analizowanych substancji z matrycy biologicznej po zastosowaniu rozpuszczalników organicznych takich jak octan etylu, dichlorometan czy acetonitryl. Przeprowadzone badania wykazały, że najlepszym odczynnikiem do izolacji nitroimidazoli z testowanych matryc jest acetonitryl, który powodował denaturację białek i ekstrahował mniejszą ilość interferujących komponentów matrycy w porównaniu z innymi rozpuszczalnikami.

Biorąc pod uwagę właściwości fizyko-chemiczne badanych związków i rodzaj matryc, do oczyszczania otrzymanych ekstraktów wybrano kolumnienki ekstrakcji do fazy stałej (SPE - *ang. solid-phase extraction*) wypełnione krzemionkowym sorbentem kationowymiennym (SCX - *ang. strong cation exchange*). W procedurze tej do uzyskania dodatnio naładowanych części analitów zastosowano kwas octowy. W porównaniu do innych testowanych faz, ekstrakcja w układzie jonowymiennym okazała się bardziej selektywna ze względu na specyficzne i wysoce energetyczne oddziaływania kulombowskie między analitem naładowanym dodatnio a ujemnie naładowanym sorbentem kationowymiennym. Zastosowanie tego rodzaju fazy pozwoliło na pozbycie się substancji interferujących z matrycy i tym samym uzyskanie bardziej czystych ekstraktów. Po zagęszczeniu oczyszczonych ekstraktów w strumieniu azotu, suchą pozostałość rozpuszczono w fazie ruchomej i poddano analizie LC-MS/MS.

Do analizy ilościowej użyto metodę rozcieńczeń izotopowych (IDMS - *ang. isotope dilution mass spectrometry*) co w znaczny sposób zminimalizowało błędy wynikające z różnego odzysku analitów w procesie przygotowania próbki oraz ze zmienności efektywności jonizacji związków w źródle jonów co przełożyło się na zwiększenie dokładności metody. Zastosowane jako wzorce wewnętrzne deuterowane pochodne nitroimidazoli i ich metabolitów są standardami wewnętrznymi bliskimi doskonałości, gdyż od oznaczanych substancji różnią się tylko niewiele masą, a ich współczynniki odpowiedzi są identyczne.

Opracowana procedura oznaczania 7 nitroimidazoli w mięśniach, osoczu i jajach z zastosowaniem LC-MS/MS została zwalidowana zgodnie z wymaganiami Decyzji Komisji 2002/657/WE. Wyznaczono liniowość sygnału, zakres roboczy, specyficzność, odzysk, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, limit decyzyjny i zdolność wykrywania, stabilność i odporność dla każdej z testowanych matryc drobiu. Uzyskane wartości odzysku

mieściły się w zakresie od 73,2% do 110,6% przy współczynniku zmienności (CV) w warunkach powtarzalności i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej mniejszym od 14%. Wartości te mieściły się w granicach dopuszczalnych odchyłeń na każdym ze sprawdzanych poziomów stężeń. Wyznaczone wartości krytyczne  $CC\alpha$  były w granicach od 0,05  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,53  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a  $CC\beta$  od 0,08  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,90  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i były poniżej „rekomendowanego stężenia” 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Dodatkowo w teście odporności wykazano przydatność opracowanej metody do analizy próbek świń, bydła i ryb. Ponadto istotnym elementem było oszacowanie niepewność wyniku pomiaru.

Procedura badawcza oznaczania nitroimidazoli w mięśniach, osoczu i jajach z wykorzystaniem LC-MS/MS została dotychczas 5-krotnie sprawdzona w międzynarodowych badaniach biegłości organizowanych przez Central Science Laboratory (CSL) w Wielkiej Brytanii w ramach programu FAPAS (test 0296, 02120, 02217) oraz EURL ds. nitroimidazoli w Berlinie (NIIM\_09/07, NIIM\_05/11). Otrzymane wyniki z-score były satysfakcjonujące i potwierdziły wiarygodność wyników otrzymywanych przy użyciu opracowanej metody.

Dodatkowo w celu wyznaczenia odtwarzalności zewnątrzlaboratoryjnej oraz zweryfikowania kompetencji analitycznych regionalnych laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW) zorganizowane zostały 5-krotnie badania biegłości z ich udziałem. Wszystkie laboratoria w każdej rundzie uzyskały satysfakcjonujące wyniki z-score potwierdzając swoją biegłość w oznaczaniu nitroimidazoli w mięśniach i jajach na poziomie poniżej „rekomendowanego stężenia”.

Opracowana metoda została wdrożona do realizacji krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego w 2007 r. i stosowana jest do dnia dzisiejszego. Od 2008 r. analizę próbek w kierunku nitroimidazoli, oprócz laboratorium PIWet-PIB w Puławach pełniącego funkcję Krajowego Laboratorium Referencyjnego, wykonują laboratoria ZHW w Białymstoku, Poznaniu, Wrocławiu i Warszawie, a od 2014 r. również laboratorium ZHW w Katowicach.

Ponadto duża liczba cytowań (17) świadczy o tym, że praca **H2** została dostrzeżona i ma wpływ na rozwój nauki światowej.

Powstała w późniejszym czasie sugestia EURL ds. nitroimidazoli, by kraje o znaczącej produkcji mleka krowiego również prowadziły kontrolę występowania nitroimidazoli w mleku, była powodem opracowania kolejnej metody analitycznej opisanej w pracy **H3**.

Punktem wyjściowym opracowania metody oznaczania nitroimidazoli w mleku była opisana powyżej metoda oznaczania tych związków w mięśniach, osoczu i jajach. W odróżnieniu od wcześniej używanej standardowej krzemionkowej kolumny chromatograficznej, zastosowano w tej metodzie kolumnę chromatograficzną wyprodukowaną w nowej technologii „core-shell” i po zoptymalizowaniu warunków elucji w gradiencie uzyskano skrócenie czasu analizy chromatograficznej z 30 do 12 min.

Z przeglądu dostępnego piśmiennictwa wynikało, że ekstrakcji nitroimidazoli z mleka najczęściej dokonuje się acetonitrylem i dlatego też ten rozpuszczalnik został wybrany

do izolacji analitów w tej metodzie. Przy wyborze sposobu oczyszczania ekstraktów i oddzielania analitów od endogennych składników matrycy porównywano możliwości analityczne trzech różnych sorbentów SPE: polimerycznych sorbentów w odwróconym układzie faz, polimerycznych sorbentów SCX oraz krzemionkowych sorbentów SCX. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w porównaniu do innych testowanych kolumniek SPE, te z krzemionkowym sorbentem SCX dawały lepsze lub porównywalne odzyski analitów, dlatego zostały wybrane do dalszych badań. Dodatkową zaletą wybranych kolumniek SPE był fakt, że są one wykorzystywane w analizie nitroimidazoli w mięśniach, osoczu i jajach. Również w tej metodzie do analizy ilościowej zastosowano metodę IDMS, która niweluje efekt matrycy, czyli obniżenia lub podwyższenia sygnału spowodowanego oddziaływaniem składników matrycy i analitu. Rozwiązanie to umożliwiło sporządzanie krzywej kalibracyjnej opartej na analizie roztworów wzorcowych bez konieczności przygotowywania próbek wzbogaconych.

Opracowana procedura oznaczania 7 nitroimidazoli w mleku z zastosowaniem tego samego protokołu przygotowania próbek, co w mięśniach, osoczu i jajach została zwalidowana zgodnie z wymaganiami Decyzji Komisji 2002/657/WE i spełnia wszystkie wymagania analityczne stawiane metodom przeznaczonym do oznaczania pozostałości substancji zakazanych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Odzysk mieścił się w zakresie od 96,6% do 105,2% przy CV mniejszym od 8,7% dla każdego analitu. Wartości krytyczne CC $\alpha$  były w granicach od 0,11  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a CC $\beta$  od 0,19  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,37  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i były poniżej „rekomendowanego stężenia” 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Wykazano również przydatność opracowanej metody do analizy mleka różnych gatunków zwierząt (krów, kóz, owiec) o różnej zawartości tłuszczu (niskiej i wysokiej) oraz mleka poddawanego różnym procesom technologicznym (surowego, pasteryzowanego i UHT).

Następnym wyzwaniem analitycznym było opracowanie metody oznaczania nitroimidazoli w kolejnej matrycy, jaką był miód. Podjęcie tego tematu w czasie, gdy potencjalne ryzyko występowania nitroimidazoli w miodzie importowanym do Unii Europejskiej znalazło potwierdzenie w raportach RASFF, wyszło naprzeciw potrzebom określenia, czy w analizowanym materiale znajdują się te niedozwolone substancje.

Ponadto badania nad opracowaniem warunków analizy pozostałości nitroimidazoli w miodzie były realizowane w ramach naukowego projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr IP2011 036571 Iuventus Plus, którego byłam kierownikiem, co świadczy o istotnym znaczeniu podjętego zagadnienia.

W wyniku przeprowadzonych badań, opisanych w pracy **H4**, opracowano warunki analityczne oznaczania pozostałości 14 nitroimidazoli w miodzie z wykorzystaniem LC-MS/MS.

W odróżnieniu od wcześniej analizowanych matryc miód jest wysoce złożoną matrycą i wymaga zastosowania osobnego, bardziej złożonego toku analitycznego. Różnorodność składu miodu, zależna w dużej mierze od regionu, okresu wegetacji i pory zbioru, sprawia, że stanowi on, pośród innych matryc, największe wyzwanie w analityce pozostałości substancji chemicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Wykazano, że najlepszym odczynnikiem do izolacji nitroimidazoli z miodu jest roztwór octanu amonu o pH 6. Ustalono również optymalne warunki izolacji poprzez wytrząsanie przez przynajmniej 1 min. oraz wirowanie przy 2200 g przez 5 min. Przy wyborze sposobu oczyszczania tak otrzymanych ekstraktów i oddzielania analitów od endogennych składników matrycy porównywano możliwości analityczne dwóch różnych kolumniek SPE: z krzemionkową fazą kationowymienną oraz z polimerami z odwzorowaniem cząsteczkowym (MIP – *ang. molecularly imprinted polymers*). Polimery MIP są sorbentami posiadającymi w swojej strukturze miejsca wiążące dostosowane do rozmiaru, trójwymiarowego kształtu i grup funkcyjnych analitu lub grupy analitów. W stosunku do konwencjonalnych sorbentów SPE, ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem polimerów z odwzorowaniem cząsteczkowym (MISPE – *ang. molecularly imprinted solid-phase extraction*) odznacza się większą selektywnością i stabilnością w trudnych warunkach chemicznych. Uzyskane wyniki badań wskazały, że przy zastosowaniu fazy MIP dochodzi do bardziej selektywnej interakcji pomiędzy cząsteczkami sorbentu a analizowanymi związkami niż przy użyciu krzemionkowej fazy SCX, co w efekcie przełożyło się na większą ilościowo i jakościowo separację endogennych składników matrycy od analizowanych substancji. Dzięki zastosowaniu kolumniek MISPE otrzymano czystsze ekstrakty a co za tym idzie uzyskano niższe poziomy oznaczanych stężeń w analizowanych próbkach miodu.

Dodatkowo oceniono efekt matrycy (ME - *ang. matrix effect*), skuteczność ekstrakcji (EE - *ang. extraction efficiency*) i wydajność procesu (PE - *ang. process efficiency*) zgodnie z zaproponowanym w literaturze schematem [33]. Poziom ME, EE z i bez matrycy oraz PE porównano dla dwóch protokołów przygotowania próbki: z zakwaszonym acetonitrylem oraz zakwaszonym octanem etylu użytym jako rozpuszczalnik eluujący anality z kolumniek MISPE. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w stosunku do zakwaszonego acetonitrylu, zakwaszony octan etylu, stosowany jako eluent z MISPE, zapewnia wyższe odzyski wszystkich analitów z wyjątkiem dwóch nitroimidazoli i sprawia, że otrzymane ekstrakty miodu są czystsze.

Użycie zoptymalizowanej ekstrakcji MISPE oraz techniki LC-MS/MS umożliwiło uzyskanie wysokiej selektywności i czułości metody oznaczania metronidazolu, dimetridazolu, ronidazolu, ipronidazolu i ich metabolitów: hydroksymetronidazolu, hydroksymetylonitroimidazolu i hydroksyipronidazolu oraz karnidazolu, menidazolu, nimorazolu, ornidazolu, seknidazolu, ternidazolu i tinidazolu w miodzie, a co za tym idzie sprostało założonym celom pracy badawczej. Procedura umożliwia oznaczanie trzech nowych związków (seknidazolu, menidazolu i nimorazolu), które potencjalnie mogą występować w próbkach żywności pochodzenia zwierzęcego i zagrażać zdrowiu konsumenta, a nie zostały ujęte w żadnej jak dotąd opublikowanej metodzie analitycznej. Opracowana procedura badawcza została zwalidowana zgodnie z zaleceniami zawartymi w Decyzji Komisji 2002/657/WE i spełnia wszystkie wymagania analityczne stawiane metodom przeznaczonym do oznaczania pozostałości substancji zakazanych w żywności pochodzenia zwierzęcego. Walidacji opracowanej metody dokonano wyznaczając liniowość sygnału, zakres roboczy, specyficzność, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, odzysk, CC $\alpha$ , CC $\beta$ , efekt matrycy i stabilność w materiale biologicznym. Wartości odzysków (od 96.0% do 105.9%) oraz CV w warunkach powtarzalności (od 1,0% do 6,7%) i odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej (od 1,2%

do 10,1%) mieściły się w granicach dopuszczalnych odchyłeń na każdym ze sprawdzanych poziomów stężeń. Wyznaczone wartości  $CC\alpha$  i  $CC\beta$  znajdowały się odpowiednio w zakresie od 0,110  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,387  $\mu\text{g}/\text{kg}$  oraz od 0,179  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 0,508  $\mu\text{g}/\text{kg}$  i były niższe od „rekomendowanego stężenia”. Ponadto wykazano przydatność metody do analizy miodu różnego rodzaju (wielokwiatowego, akacjowego, lipowego, akacjowo-lipowego, spadziowego, gryczanego, rzepakowego, z mniszka lekarskiego oraz wrzosowo-nawłociowego), o różnej konsystencji (płynnej lub stałej), różnego koloru (od żółtego do brązowego) oraz o różnym pochodzeniu geograficznym. Na podstawie badań stabilności analitów w matrycy biologicznej stwierdzono, że nitroimidazole są stabilne przez przynajmniej 28 tygodni w miodzie przechowywanym w temperaturze 4 °C, a na proces degradacji nitroimidazoli wpływają zarówno wysoka temperatura jak i ekspozycja na światło.

Przedstawione powyżej opracowane i zwalidowane metody oznaczania 5-nitroimidazoli i ich metabolitów w mięśniach, jajach, osoczu, mleku i miodzie (**H2-H4**) zostały akredytowane zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025 i wdrożone do krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego. Przy ich użyciu stwierdzono obecność metronidazolu w 2 próbkach indyka i po raz pierwszy w Polsce w 1 próbce miodu. (**H1**). W wyniku postępowania administracyjnego cała partia tej żywności nie została dopuszczona do obrotu handlowego, a co za tym idzie konsumpcji przez człowieka.

#### ***Określenie rozmieszczenia, metabolizmu i czasu zanikania metronidazolu w tkankach i narządach pstrąga tęczowego***

Jak wspomniano we wstępie najczęściej wykrywanym nitroimidazolem w badaniach kontrolnych pozostałości w Unii Europejskiej jest metronidazol, który występował w próbkach drobiu, świń oraz jaj. Ostatnie doniesienia wykazały obecność tego leku również w mięśniach pstrąga tęczowego [34]. W dostępnym, bardzo ograniczonym, piśmiennictwie brak jest aktualnych danych na temat zanikania metronidazolu u ryb, a te które są dostępne [26], zostały otrzymane przy użyciu metod analitycznych mniej czułych niż obecnie stosowane. Dlatego zastosowanie wcześniej opracowanej, bardziej czulej metody analitycznej pozwoliło w drugiej części badań, przedstawionej w pracy **H5**, dokonać weryfikacji czasu zanikania i metabolizmu oraz po raz pierwszy zbadać rozmieszczenie metronidazolu w tkankach i narządach pstrągów tęczowych, które otrzymywały lek. Ponadto badania te pozwoliły ustalić, jakie części ryby powinny być analizowane i w jakich warunkach przechowywane by otrzymać wiarygodne wyniki analizy i wykryć nielegalne stosowanie tego leku u ryb przeznaczonych do konsumpcji.

W przeprowadzonym doświadczeniu pstrągom tęczowym podawano metronidazol w paszy w dawce 25 mg/kg masy ciała przez 7 dni. W odpowiednich odstępach czasu z ryb pobierano mięśnie, skórę, mięśnie ze skórą w naturalnych proporcjach, nerki, wątrobę i skrzela. Pobrane narządy i tkanki poddawano analizie LC-MS/MS i oznaczano stężenie metronidazolu i jego głównego metabolitu. Na podstawie uzyskanych wyników wykazano, że metronidazol przechodzi do wszystkich badanych narządów i tkanek pstrąga tęczowego. Najwyższe stężenia metronidazolu występowały po upływie jednego dnia od zakończenia leczenia i kształtowały się na poziomie 14 999, 20 269, 15 070, 10 102 i 16 467  $\mu\text{g}/\text{kg}$

odpowiednio w mięśniach, skórze, nerkach, wątrobie i skrzelach. We wszystkich narządach i tkankach metronidazol metabolizowany był do hydroksymetronidazolu przez cały czas doświadczenia i stanowił do 7% stężenia substancji macierzystej. Ustalono, że metronidazol na poziomie zbliżonym do limitu decyzyjnego metody (0,2 µg/kg) utrzymywał się w mięśniach, skórze, mięśniach ze skórą do 42 dnia, a w nerkach, wątrobie i skrzelach lek był obecny do 28 dni od zakończenia terapii. Natomiast hydroksymetronidazol był szybciej eliminowany z organizmu ryby i jego pozostałości obecne były w samych mięśniach do 21 dnia od zakończenia podawania metronidazolu z paszą w dawce 25 mg/kg masy ciała przez 7 dni. Dla obu związków określono okresy półtrwania, które wynosiły od 1,83 do 2,53 dni dla MNZ i od 1,24 do 2,12 dni dla MNZOH. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia pokazały, że substancja macierzysta występuje w wyższych stężeniach niż jej metabolit i dłużej się utrzymuje we wszystkich badanych tkankach i narządach i dlatego jest najbardziej odpowiednim markerem pozostałości wskazującym na zastosowanie metronidazolu u pstrąga tęczowego.

Według przepisów unijnych, mianem części jadalnych ryb określa się mięśnie i skórę w naturalnych proporcjach i taka część ryby jest tkanką docelową przy badaniu pozostałości [18]. Jednakże na podstawie wyników przeprowadzonego doświadczenia wykazano, że w porównaniu do mięśni ze skórą stężenie MNZ i MNZOH w samych mięśniach bez skóry było wyższe i utrzymywało się dłużej. Dlatego same mięśnie bez skóry wydają się być bardziej odpowiednią matrycą w analizie pozostałości metronidazolu w pstrągach tęczowych. Ponadto uzyskane wyniki dowiodły, że próbki mięśni i skóry pobrane od ryb powinny być jak najszybciej zamrożone by można było otrzymać wiarygodne wyniki analizy i wykryć nielegalne stosowanie tego leku u ryb przeznaczonych do konsumpcji.

### Osiągnięcia

- Opracowanie wieloskładnikowej, potwierdzającej procedury analitycznej z użyciem jednego, wspólnego protokołu przygotowania próbki umożliwiającej oznaczenie nitroimidazoli i ich metabolitów w mięśniach, osoczu, jajach i mleku różnych gatunków zwierząt z wykorzystaniem LC-MS/MS i zastosowaniem metody rozcieńczeń izotopowych. Opracowana metoda spełnia międzynarodowe wymagania analityczne i została wdrożona do realizacji krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego i przy jej wykorzystaniu wykryto oraz potwierdzono obecności metronidazolu w mięśniach indyków (**H1- H3**).
- Opracowanie selektywnej metody oznaczania 14 nitroimidazoli i ich metabolitów, w tym nigdy wcześniej nie analizowanych w tej matrycy związków takich jak menidazol, nimorazol i seknidazol, w miodzie z wykorzystaniem LC-MS/MS i wdrożenie jej do realizacji krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było wykrycie oraz potwierdzenie (po raz pierwszy w Polsce) obecności metronidazolu w miodzie (**H1, H4**).



- Określenie rozmieszczenia, metabolizmu i czasu zanikania metronidazolu w tkankach i narządach pstrąga tęczowego oraz ustalenie, jakie części ryby powinny być analizowane i w jakich warunkach przechowywane by otrzymać wiarygodne wyniki analizy umożliwiające wykrycie nielegalnego stosowania metronidazolu u ryb przeznaczonych do konsumpcji (H5).

### Piśmiennictwo

- [1] Giguère S., Prescott J.F., Dowling P.M.: Antimicrobial therapy in veterinary medicine, fifth edition. John Wiley & Sons, Inc. 2013.
- [2] Roliński Z.: Farmakologia i farmakoterapia weterynaryjna. PWRiL. 2008.
- [3] Treves-Brown K.M.: Applied fish pharmacology. Kluwer Academic Publishers. 2000.
- [4] Joint FAO/WHO Food Standards Programme. Codex Committee on residues of veterinary drugs in foods. Discussion paper on veterinary drugs in honey production. 2010, Agenda Item 10 CX/RVDF 10/19/10.
- [5] Commission Regulation (EC) No 1798/95. Off J Eur Commun. L 174, 26.07.1995, 20.
- [6] Commission Regulation (EC) No 3426/93. Off J Eur Commun. L 312, 15.12.1993, 15.
- [7] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Residues of some veterinary drugs in animals and foods. FAO Food and Nutrition Paper 41/2. Monographs prepared by the Thirty-Fourth Meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 30 January - 8 February 1989.
- [8] Commission Regulation (EC) No 613/98. Off J Eur Commun. L 82, 19.03.1998, 14.
- [9] Aerts R.M.L., Egberink I.M., Kan C.A., Keukens H.J., Beek W.M.J.: Liquid chromatographic multicomponent method for determination of residues of ipronidazole, ronidazole, and dimetridazole and some relevant metabolites in eggs, plasma, and feces and its use in depletion studies in laying hens. J. AOAC Int. 1991, 74, 46-55.
- [10] The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report. Metronidazole. In 1997.
- [11] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food. WHO Food Additives Series, No. 25. 1990.
- [12] The European Agency for the Evaluation of Medical Products. Committee for Veterinary Medicinal Products. Summary Report. Dimetridazole. 1996.
- [13] IARC: International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Overall evaluations of carcinogenicity. Suppl. 7. 1987, 250.
- [14] Dyrektywa Komisji 98/19/WE. Dz.U. L 96 z 28.3.1998, str. 39.
- [15] Rozporządzenie Komisji (WE) NR 45/1999. Dz.U. L 6 z 12.01.1999, str. 3.
- [16] Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2205/2001. Dz.U. L 297 z 15.11.2001, str. 3.
- [17] Rozporządzenie Rady (EWG) NR 2377/90. Dz.U. L 224 z 18.08.1990, str. 1.
- [18] Rozporządzenie Komisji (UE) NR 37/2010. Dz.U. L 15 z 20.01.2010, str. 1.
- [19] Dyrektywa Rady 96/23/WE. Dz.U. L 125 z 23.05.1996, str. 10.
- [20] European Food Safety Authority; Report for 2008 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in food of animal origin in the Member States. EFSA Journal 2010; 8(4):1559.
- [21] European Food Safety Authority; Report for 2009 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 2011:158.
- [22] European Food Safety Authority; Report for 2010 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. Supporting Publications 2012:212.
- [23] European Food Safety Authority; Report for 2011 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2013:EN-363.
- [24] European Food Safety Authority; Report for 2012 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2014:EN-540.

- [25] Commission Staff Working Documents on the Implementation of National Residue Monitoring Plans in the Member States in 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007 (Council Directive 96/23/EC).
- [26] Wagil M., Maszkowska J., Bialk-Bielinska A., Caban M., Stepnowski P., Kumirska J.: Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples. *Chemosphere*. 2015, 119 Suppl, S28-34.
- [27] CRL Guidance Paper, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. 2007, December 2007.
- [28] Decyzja Komisji 2002/657/WE. Dz.U. L 221 z 17.08.2002, str. 8.
- [29] PN-EN ISO/IEC 17025:2005 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących.
- [30] Semeniuk S., Posyniak A., Niedzielska J., Zmudzki J.: Determination of nitroimidazole residues in poultry tissues, serum and eggs by high-performance liquid-chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 1995, 9, 238-242.
- [31] Polzer J., Stachel C., Gowik P.: Treatment of turkeys with nitroimidazoles impact of the selection of target analytes and matrices on an effective residue control. *Anal. Chim. Acta*. 2004, 521, 189-200.
- [32] Żmudzki J.: Kontrola pozostałości chemicznych w tkankach zwierząt i żywności - ważny element w ochronie zdrowia publicznego. *Post Nauk Rol.* 2008, 2, 49-59.
- [33] Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M.: Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 2003, 75, 3019-3030.
- [34] Sorensen L.K., Hansen H.: Determination of metronidazole and hydroxymetronidazole in trout by a high-performance liquid chromatographic method. *Food Addit. Contam.* 2000, 17, 197-203.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych**

### **5a) Pozostały dorobek publikacyjny**

#### **Problem występowania zieleni malachitowej u ryb**

Stosowana w hodowli ryb zieleń malachitowa (MG) jest syntetycznym barwnikiem o szerokim spektrum działania przeciw grzybom, pierwotniakom pasożytniczym i bakteriom chorobotwórczym stosowanym w hodowli ryb. Jednak z powodu wykazywania właściwości kancerogennych, mutagennych i teratogennych nigdy nie została włączona do grupy substancji leczniczych oficjalnie zarejestrowanych w Unii Europejskiej, jako lek weterynaryjny dopuszczony do stosowania w hodowli zwierząt, od których lub z których pozyskuje się żywność. W celu określenia stopnia potencjalnego skażenia ryb tym barwnikiem podjęłam się opracowania takiej metody analitycznej, która umożliwiłaby wyodrębnienie, oznaczenie i ilościowe potwierdzenie pozostałości substancji macierzystej i jej głównego metabolitu, zieleni leukomalachitowej (LMG), z wysoką precyzją oraz dokładnością.

W opracowanej metodzie po raz pierwszy na świecie zastosowano oryginalne i nowatorskie rozwiązanie użycia dwóch detektorów UV-VIS i FLD bez konieczności stosowania etapu utleniania bezbarwnego metabolitu do barwnej substancji macierzystej. Wykorzystanie fluoryzujących właściwości zieleni leukomalachitowej do jej wykrywania i użycie chromatografii cieczowej umożliwiło opracowanie metody badawczej, która nie tylko przewyższała efektywnością dotychczas stosowane na świecie metody, ale jednocześnie pozwalała na wyeliminowanie z praktyki laboratoryjnej odczynników skażających środowisko i wykazujących toksyczny wpływ na organizm ludzki.

W kolejnym etapie pracy przeprowadziłam badania na temat kinetyki rozmieszczenia i zanikania zieleni malachitowej w tkankach i narządach ryb. Wyniki badań pokazały, że po trzygodzinnej kąpieli ryb w roztworze zieleni malachitowej o stężeniu 2 mg/l MG bardzo szybko metabolizowana była do LMG, która następnie była bardzo wolno eliminowana z narządów i tkanek. Wyższe stężenia MG i LMG zaobserwowano w oskrzelach, wątrobotrzustce i nerkach w porównaniu ze śledzioną i mięśniami. Zieleń malachitowa najdłużej utrzymywała się w nerkach, wątrobotrzustce i śledzionie (do 112 dnia), podczas gdy w skrzelach i mięśniach do 56 dnia trwania doświadczenia. Stężenie LMG zmniejszało się wolniej i metabolit ten znajdowano w nerkach i mięśniach jeszcze w 252 dniu od zakończenia eksperymentu.

Dodatkowo zbadano wpływ obróbki termicznej na zawartość MG i LMG w mięśniach ryb. Wykazano, że procesy kulinarne przeprowadzane w wysokiej temperaturze nie zapewniają całkowitej redukcji pozostałości MG i LMG, a zawartość MG w mięśniach ryb zmniejsza się o 54% w czasie 15 min. gotowania w wodzie oraz pieczenia. Natomiast jedyną metodą, w której stężenie LMG ulega obniżeniu jest działanie mikrofal (40% w ciągu 1 min.).

Badania te były realizowane w ramach promotorskiego projektu badawczego KBN nr 2 PO6K 007 29, a wyniki przeprowadzonych doświadczeń zostały przedstawione w mojej pracy doktorskiej pod tytułem „Pozostałości zieleni malachitowej w rybach”, którą obroniłam w 2006 r. Praca ta została uznana przez Komitet Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą pracę doktorską z zakresu metrologii chemicznej, a poniżej wymienione publikacje z tego zakresu są często cytowane.

**Mitrowska K.**, Posyniak A. (2004) Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 48, 173-176. (IF<sub>2004</sub> = 0,192; MNiSW<sub>2004</sub> = 10; Liczba cytowań = 11)

**Mitrowska K.**, Posyniak A., Zmudzki J. (2005) Determination of malachite green and leucomalachite green in carp muscle by liquid chromatography with visible and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A* 1089, 187-192. (IF<sub>2005</sub> = 3,096; MNiSW<sub>2005</sub> = 24; Liczba cytowań = 73)

**Mitrowska K.**, Posyniak A., Zmudzki J. (2008) Rozmieszczenie i kinetyka zanikania zieleni malachitowej i zieleni leukomalachitowej w tkankach i narządach karpia. *Medycyna Weterynaryjna* 64, 1055-1058. (MNiSW<sub>2008</sub> = 10)

**Mitrowska K.**, Posyniak A., Zmudzki J. (2007) The effects of cooking on residues of malachite green and leucomalachite green in carp muscles. *Analytica Chimica Acta* 586, 420-425. (IF<sub>2007</sub> = 3,190; MNiSW<sub>2007</sub> = 24; Liczba cytowań = 16)

**Mitrowska K.**, Posyniak A., Zmudzki J. (2008) Determination of malachite green and leucomalachite green residues in water using liquid chromatography with visible and fluorescence detection and confirmation by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1207, 94-100. (IF<sub>2008</sub> = 3,756; MNiSW<sub>2008</sub> = 24; Liczba cytowań = 24)

### **Metodyka oznaczania leków przeciwbakteryjnych w tkankach zwierzęcych i żywności**

Szeroką grupę leków stosowanych w praktyce weterynaryjnej stanowią leki przeciwbakteryjne, które po zastosowaniu mogą pozostawać w tkankach i narządach zwierząt oraz ich produktach - mleku, jajach i miodzie, stając się potencjalnym źródłem niekorzystnych oddziaływań na zdrowie konsumentów żywności pochodzenia zwierzęcego. Okazuje się bowiem, że nawet małe dawki leków przeciwbakteryjnych przyjmowane

z żywnością przez dłuższy okres czasu mogą przyczyniać się do powstawania w organizmie ludzkim lekoopornych szczepów bakteryjnych. Ponadto mogą wywoływać reakcje alergiczne lub też zaburzenia w prawidłowym funkcjonowaniu tkanek lub narządów (działanie mutagenne i kancerogenne).

W związku z tym zaistniała potrzeba opracowania procedur badawczych, które umożliwią wykonywanie oznaczeń zawartości różnych grup leków przeciwbakteryjnych takich jak sulfonamidy, tetracykliny i fluorochinolony w materiale biologicznym zwierzęcego pochodzenia. Efektem prowadzonych badań było opracowanie i wdrożenie do praktyki laboratoryjnej wielu nowych, oryginalnych procedur badawczych, które spełniają przyjęte w tym zakresie standardy światowe.

W metodzie opracowanej dla oznaczania sulfonamidów z wykorzystaniem LC-FLD dokonano daleko idących zmian w porównaniu do dotychczas stosowanych procedur. W metodzie tej do przygotowania próbek do analizy zastosowano dyspersyjną ekstrakcję do fazy stałej (dSPE - *ang. dispersive solid-phase extraction*). Do izolacji sulfonamidów z matrycy użyto rozpuszczalnika organicznego i do otrzymanych ekstraktów dodawano niewielką ilość sorbentu, który wyłapywał zanieczyszczenia pochodzące z matrycy biologicznej. Zastosowane rozwiązanie analityczne w bardzo znacznym stopniu uprościło przygotowanie próbek do badań, dzięki czemu analiza stała się bardzo szybka i mało kosztowna. Zaproponowany sposób postępowania był pierwszym na świecie opisanym w analizie leków, a wiarygodność wyników uzyskiwanych tą metodą została potwierdzona w międzynarodowym programie badań biegłości FAPAS.

Wyniki badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Posyński A., Zmudzki J., **Mitrowska K.** (2005) Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken by muscle liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 1087, 259-264. (IF<sub>2005</sub> = 3,096; MNiSW = 24; Liczba cytowań = 68)

W metodzie oznaczania chlorotetracykliny i jej formy epimerycznej z wykorzystaniem LC-DAD zastosowano nowatorskie rozwiązanie przygotowania próbki poprzez użycie polimerycznego sorbentu SPE dla oddzielenia analizowanych substancji od endogennych składników matrycy. Warunki analizy zostały tak dobrane, że stało się możliwe nie tylko oznaczanie samej chlorotetracykliny, ale i jej formy epimerycznej, 4-epi-chlorotetracykliny. Opracowana procedura spełniła stawiane wymagania i stanowi znaczący postęp w analizie tetracyklin, gdyż dotychczas stosowane metody posiadały pewien stopień zawodności, a ponadto nie miały możliwości analizowania ich epimerów.

Wyniki badań zostały przedstawione w następującej publikacji:

Posyński A., **Mitrowska K.**, Zmudzki J., Niedzielska J. (2005) Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys. *Journal of Chromatography A* 1088, 169-174. (IF<sub>2005</sub> = 3,096; MNiSW<sub>2005</sub> = 24; Liczba cytowań = 17)

Za prace dotyczące oznaczania zieleni malachitowej, sulfonamidów oraz tetracyklin w tkankach zwierzęcych i żywności zespół naukowy: Posyński A., Żmudzki J., Mitrowska K., Niedzielska J. został wyróżniony dyplomem uznania Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych z rekomendacji Komitetu Nauk Weterynaryjnych Polskiej Akademii Nauk w 2006 r.

W metodzie oznaczania fluorochinolonów do przygotowania próbki do analizy instrumentalnej zastosowano dSPE. Najkorzystniejszy rozdział chromatograficzny uzyskano stosując oktadecylovą kolumnę analityczną i mieszaninę acetonitrylu z kwasem fosforowym i heksanosulfonowym a detekcję przeprowadzono przy użyciu detektora fluorescencyjnego. Opracowana metoda została zwalidowana zgodnie z kryteriami zawartymi w Decyzji Komisji 2002/657/WE i sprawdzona w badaniach biegłości.

Wyniki badań przedstawiono w następującej publikacji:

Posyński A., **Mitrowska K.** (2008) Analytical procedure for the determination of fluoroquinolones in animal muscle. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 52, 427-430. (IF<sub>2008</sub> = 0,337; MNiSW<sub>2008</sub> = 15; Liczba cytowań = 6)

Aplikacyjny charakter badań prowadzonych nad opracowaniem wymienionych trzech metod oznaczania sulfonamidów, tetracyklin i fluorochinolonów w materiale biologicznym został potwierdzony poprzez włączenie ich do krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego. O doniosłości odkryć dokonanych w zakresie oznaczania tych leków w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego przemawia fakt, że wyniki tych badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym i są dość często cytowane.

### **Analityka i kinetyka zanikania sulfonamidów w miodzie**

W Unii Europejskiej stosowanie leków przeciwbakteryjnych, w tym sulfonamidów, w pszczelarstwie jest nielegalne, gdyż nie ma dla nich wyznaczonych wartości MRL w miodzie. W konsekwencji miód zawierający pozostałości tych leków nie może być sprzedawany. Pomimo tego, wyniki krajowych badań kontrolnych pozostałości i dane RASFF pokazują, że pozostałości sulfonamidów nadal znajdowane są w miodzie.

W celu zwiększenia zakresu analitycznego dotychczas stosowanej metody podjęto się opracowania nowej, ulepszonej procedury oznaczania sulfonamidów w miodzie. W wyniku przeprowadzonych badań udało się uzyskać rozdział chromatograficzny siedmiu sulfonamidów i jednego wzorca wewnętrznego z wykorzystaniem nowej kolumny chromatograficznej. Detekcja dokonywana była z użyciem detektora fluorescencyjnego, który jest bardzo czuły i selektywny i dzięki temu możliwe było oznaczanie sulfonamidów na niskich poziomach stężeń w bardzo złożonej matrycy, jaką jest miód. Opracowana procedura została zwalidowana a otrzymane wartości CC $\alpha$  i CC $\beta$  były w zakresach od 25,21  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 37,51  $\mu\text{g}/\text{kg}$  oraz od 26,15  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 49,50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

Procedura została włączona do programu kontroli pozostałości a najczęściej oznaczanymi sulfonamidami w miodzie okazały się sulfatiazol, sulfacetamid i sulfametazyna. Warto podkreślić jest to, że zastosowanie nowej metodyki w kontroli pozostałości sulfonamidów doprowadziło do wyeliminowania z rynku miodu pochodzącego z pasiek krajowych i z importu zawierającego te niedozwolone substancje.

W oparciu o doświadczenie związane z kontrolowaniem pozostałości sulfonamidów w miodzie nasunęło się przypuszczenie, że sulfonamidy mogą pozostawać w miodzie bardzo długo. Jednak z dostępnego piśmiennictwa nie wynikało jak długi może być ten okres czasu.

W związku z tym podjęto się wykonania badań, w których dokonana została ocena czasu pozostawiania sulfonamidów w miodzie. W tym celu przeprowadzono doświadczenie, w którym pszczołom do ula podano syrop cukrowy z dodatkiem Polisulfamidu (produktu zawierającego w swoim składzie sulfatiazol, sulfacetamid i sulfametazynę). W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że obecność sulfonamidów stwierdzana była w miodzie przez dwa kolejne sezony. Dopiero po 24 miesiącach od eksperymentalnego podania Polisulfamidu pszczołom nie stwierdzono występowania sulfonamidów w badanym miodzie. Istotnym wnioskiem tych badań było to, że wysokie stężenia sulfonamidów odnotowane w miodzie po 1 miesiącu od podania produktu w dużym stopniu korelowały z wysokimi stężeniami wykrywanymi w krajowych badaniach kontrolnych. Podobieństwa te wskazują na fakt, że badane w ramach kontroli pozostałości próbki pobierano w dość krótkim czasie od zastosowania Polisulfamidu w pasiece.

Wyniki wyżej opisanych badań przedstawiono w następujących publikacjach:

- Posyniak A., Jazdzewski K., Pietruszka K., **Mitrowska K.**, Gajda A. (2008) Improved analytical procedure for the determination of sulfonamides in honey. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 52, 87-91. (IF<sub>2008</sub> = 0,337; MNiSW<sub>2008</sub> = 15; Liczba cytowań = 5)
- Posyniak A., Błdek T., Jazdzewski K., Bober A., **Mitrowska K.**, Zmudzki J., Pohorecka K. (2011) The depletion of sulfonamide residues in honey after experimental treatment of honeybee (*Apis mellifera L.*) colonies. *Journal of Apicultural Science* 55, 169-175. (IF<sub>2011</sub> = 0,674; MNiSW<sub>2011</sub> = 20; Liczba cytowań = 0)

### **Metodyka oznaczania leków uspokajających w materiale biologicznym pochodzenia zwierzęcego**

Następną grupą leków stosowanych w weterynarii są związki działające na układ nerwowy, które mają właściwości uspakajające oraz relaksujące i w związku z tym są podawane w celu przeciwdziałania stresowi u zwierząt np. w czasie transportu do rzeźni.

Do grupy tej należą trankwilizery takie jak chloropromazyna, propionylopromazyna, acepromazyna, triflupromazyna, promazyna i azaperon oraz beta-blokery, w tym karazolol. Ze względu na swoje właściwości genotoksyczne chloropromazyna i inne fenotiazyny zostały całkowicie zakazane do stosowania u zwierząt, z których lub od których pozyskuje się żywność. Chloropromazyna została umieszczona w Aneksie IV Regulacji Komisji 2377/90, która obecnie jest zastąpiona Regulacją Rady 37/2010/EC, a substancję tę ujęto w tabeli 2, w której zebrano substancje zakazane. W tym samym dokumencie prawnym w tabeli 1 umieszczono azaperon i karazolol, dla których wyznaczono wartości MRL w nerkach wieprzowych, odpowiednio na poziomie 100 µg/kg dla azaperonu i 25 µg/kg dla karazololu. Natomiast podane przez EURL „rekomendowane stężenie” oznaczania chloropromazyny wynosi 10 µg/kg, podczas gdy dla innych fenotiazyn 50 µg/kg.

W związku z zaistniałą potrzebą kontrolowania obecności wyżej wymienionych substancji w żywności zwierzęcego pochodzenia, podjęłam się opracowania nowej potwierdzającej metody oznaczania chloropromazyny, propionylopromazyny, acepromazyny, triflupromazyny, promazyny, azaperonu i jego metabolitu, azaperolu, oraz karazololu w nerkach wieprzowych i bydłych z użyciem LC-MS/MS.

W opracowywanej potwierdzającej metodzie oznaczania trankwilizerów i beta-blokeru w nerkach wieprzowych i bydłych udało się ominąć etap SPE i otrzymany po ekstrakcji z acetonitrylem ekstrakt bezpośrednio poddać zagęszczeniu w strumieniu azotu. Takie postępowanie było możliwe ze względu na to, że detekcja przy użyciu spektrometru mas jest bardziej selektywna w porównaniu z detektorami UV i FLD stosowanymi w przesiewowych metodach oznaczania tych związków. Wysoka czułość i selektywność tandemowej spektrometrii mas pracującej w trybie MRM pozwoliła na detekcję analizowanych substancji w obecności wielu endogennych składników matrycy i jednoznaczną identyfikację analitów w badanej próbce. Ominięcie etapu SPE podczas przygotowania próbki umożliwiło stworzenie metody, która pozwala na analizę aż 60 próbek w ciągu 24 godzin. Należy również podkreślić, że jest to pierwsza opublikowana metoda umożliwiająca oznaczanie triflupromazyny i promazyny w nerkach wieprzowych i bydłych. Dodatkowo zbadano efekt matrycy z wykorzystaniem techniki „postcolumn infusion”. Zaobserwowaną supresję jonów zminimalizowano poprzez zastosowanie wzorców wewnętrznych będących deuterowanymi pochodnymi chloropromazyny oraz karazololu.

Opracowaną procedurę zwalidowano zgodnie z wymaganiami obowiązującymi dla metod potwierdzających a następnie wdrożono do realizacji krajowego programu badań kontrolnych pozostałości u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego i przy jej użyciu potwierdzono obecność azaperonu (37,5 µg/kg) i azaperolu (6,2 µg/kg) w próbce nerki wieprzowej. Oznaczone stężenia były poniżej MRL, który wynosi 100 µg/kg dla sumy obu związków.

Wyniki wyżej opisanych badań przedstawiono w następujących publikacjach:

**Mitrowska K.**, Posyniak A., Zmudzki J. (2009) Rapid method for the determination of tranquilizers and a beta-blocker in porcine and bovine kidney by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 637, 185-192. (IF<sub>2009</sub> = 3,757; MNiSW<sub>2009</sub> = 24; Liczba cytowań = 12)

### **Wolno żyjące ryby słodkowodne jako wskaźnik skażenia wód powierzchniowych lekami przeciwbakteryjnymi**

Kolejnym zagadnieniem, w którego realizację byłam zaangażowana były badania prowadzone w ramach zadania szczegółowego projektu badawczego rozwojowego NCBiR nr NR 12-0127-10: Zwierzęta wolno żyjące jako wskaźnik zanieczyszczeń środowiskowych i ważny element strategii bezpieczeństwa żywnościowego kraju. Wolno żyjące ryby słodkowodne jako wskaźnik skażenia wód powierzchniowych lekami przeciwbakteryjnymi. Zwierzęta wolno żyjące są uznanym wskaźnikiem skażeń środowiskowych ze względu na to, że będąc narażone bezpośrednio na oddziaływanie środowiska, w którym żyją, nagromadzają znacznie wyższe ilości wielu związków chemicznych niż zwierzęta hodowlane.

Celem badań w projekcie była ocena skażeń chemicznych środowiska wodnego na podstawie analizy ryb wolno żyjących, a te wymagały opracowania nowej wieloskładnikowej metody analitycznej oznaczania szerokiej gamy leków przeciwbakteryjnych w rybach.

Zaproponowana metoda umożliwia oznaczanie 34 związków (3 aminoglikozydów, 9  $\beta$ -laktamów, 9 fluorochinolonów, 3 makrolidów, 5 sulfonamidów, trimetoprimu i 4 tetracyklin) w mięśniach ryb z wykorzystaniem LC-MS/MS. Opracowana izolacja analitów z matrycy biologicznej oparta została na podwójnej ekstrakcji z kwasem fosforowym i kwasem heptafluorobutanowym, użytym jako pary jonowe, oraz acetonitrylem. Otrzymane ekstrakty zostały połączone i były analizowane z wykorzystaniem LC-MS/MS w jednej analizie przy użyciu kolumny chromatograficznej C18 z elucją w gradiencie. Metoda została zwalidowana zgodnie z wymaganiami Decyzja 2002/657/WE. Określono specyficzność, odzysk, powtarzalność, odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną, CC $\alpha$  i CC $\beta$ . Limit decyzyjny wahał się od 55,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 1 085  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , a zdolność wykrywania była w zakresie od 59,5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do 1 141  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Obliczony odzysk był w granicach od 96% do 111% w odniesieniu do wzorców wewnętrznych.

Godnym podkreślenia jest fakt, że jest to pierwsza opublikowana metoda analityczna umożliwiająca jednoczesne oznaczanie aż 7 grup leków przeciwbakteryjnych, w tym aminoglikozydów, z zastosowaniem jednego protokołu przygotowania próbki i pojedynczą wspólną dla wszystkich związków analizą instrumentalną.

Dodatkowo, w ramach projektu, opracowano i zwalidowano dwie nowe metody oznaczania leków przeciwbakteryjnych w wodzie i osadach dennych z wykorzystaniem LC-MS/MS.

Przy użyciu opracowanych procedur analizie poddano 443 próbki mięśni ryb, 159 próbek wody i 150 próbek osadów dennych pobranych z polskich rzek i jezior w kierunku obecności leków z grupy aminoglikozydów,  $\beta$ -laktamów, diaminopirymidyn, fluorochinolonów, linkozamidów, makrolidów, pleuromutylin, sulfonamidów i tetracyklin. W żadnej z analizowanych próbek nie stwierdzono obecności leków przeciwbakteryjnych w stężeniach wyższych od limitów decyzyjnych ustalonych dla poszczególnych analitów. Na podstawie otrzymanych wyników, można stwierdzić, że poziomy stężenie weterynaryjnych środków przeciwbakteryjnych w polskich rzekach i jeziorach nie stanowią niebezpieczeństwa.

Uzyskane w projekcie wyniki badań stanowią istotny wkład w bezpieczeństwo żywności i ochronę środowiska. Jednocześnie stanowią ważny element podstawowej bazy danych niezbędnych przy opracowywaniu dopuszczalnych limitów zawartości zanieczyszczeń środowiskowych w żywności i w samym środowisku oraz podejmowaniu różnych decyzji o charakterze administracyjnym na poziomie krajowym i unijnym.

Efekty badań zostały przedstawione w następujących publikacjach:

- Gbylik M., Posyniak A., **Mitrowska K.**, Bładek T., Żmudzki J. (2013) Multi-residue determination of antibiotics in fish by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment* 30, 940-948. (IF<sub>2013</sub> = 2,341; MNiSW<sub>2013</sub> = 30; Liczba cytowań = 5)
- Gbylik-Sikorska M., Posyniak A., **Mitrowska K.**, Gajda A., Bładek T., Śniegocki T., Żmudzki J. (2014) Occurrence of veterinary antibiotics and chemotherapeutics in fresh water, sediment, and fish of the rivers and lakes in Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* 58, 399-404. (IF<sub>2013</sub> = 0,365; MNiSW<sub>2014</sub> = 15; Liczba cytowań = 0)



## Metodyka oznaczania karotenoidów w paszach

Będąc na 2-letnim stażu podoktorskim w Instytucie Materiałów Odniesienia i Pomiarów (IRMM) Wspólnotowego Centrum Badawczego (JRC) w Belgii w EURL ds. dodatków paszowych zdobyłam doświadczenie w zakresie analityki karotenoidów.

Zgodnie z Rozporządzenie (WE) Nr 1831/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt karotenoidy należą do kategorii "dodatki sensoryczne" i do grupy funkcjonalnej "a) (ii). Barwniki; substancje, które po podaniu zwierzętom powodują zmianę barwy żywności pochodzenia zwierzęcego". Wydanie zezwolenia na stosowanie dodatków paszowych uwzględnia minimalną oraz maksymalną zawartość dodatku paszowego w mieszance paszowej pełnoporcjowej. Dlatego według Rozporządzenia (WE) Nr 882/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady w sprawie kontroli urzędowych przeprowadzanych w celu sprawdzenia zgodności z prawem paszowym i żywnościowym oraz regułami dotyczącymi zdrowia zwierząt i dobrostanu zwierząt, niezbędne są analityczne metody umożliwiające precyzyjne i dokładne oznaczania zawartości karotenoidów.

Opracowana przeze mnie wieloskładnikowa procedura badawcza umożliwia ilościowe oznaczenie 15 karotenoidów stosowanych jako dodatki paszowe przy użyciu chromatografii ciekowej z detektorem diodowym z uwzględnieniem zawartości ich izomerów geometrycznych *E* i *Z*. Bardzo dużym problemem analitycznym przy ilościowym oznaczaniu karotenoidów jest ich naturalne występowanie w postaci izomerów geometrycznych *E* i *Z*. Izomery te mają różne właściwości chemiczne, różną specyficzną absorpcję i mogą występować w paszy w różnych proporcjach, a ponadto mogą przechodzić jedne w drugie pod wpływem działania światła, wysokiej temperatury i tlenu. Ponadto dla większości analizowanych karotenoidów analityczne wzorce dostępne są tylko dla izomeru *E*, ponieważ izomery *Z* są bardzo nietrwałe. Istnieje więc ryzyko niedoszacowania wyniku oznaczenia ilościowego sumy wszystkich izomerów gdy kalibrujemy wyłącznie względem wzorców *E*. W celu pokonania tych problemów wykorzystano unikalne rozwiązanie pomiaru absorpcji w punkcie izobestycznym, czyli takiej długości fali, przy której współczynniki absorpcji są identyczne dla wszystkich badanych stereoisomerów. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń opracowano wieloskładnikową metodę oznaczania 15 karotenoidów z detekcją przy wyznaczonej długości izobastycznej (410 nm) z kalibracją wyłącznie względem wzorców *E* bez ryzyka niedoszacowania wyniku pomiaru. Ponadto przy zastosowaniu metody sympleksów opracowano warunki rozdzielenia chromatograficznego 15 karotenoidów a przy użyciu statystycznego planowania doświadczeń (DOE - *ang. Design of Experiments*) wykonano test odporności zoptymalizowanych warunków chromatograficznych.

Zastosowane w procedurze rozwiązania analityczne mają nowatorski charakter i dzięki temu spełnia ona wymagania stawiane nie tylko przez międzynarodowe gremia nadzorujące kontrolę dodatków stosowanych w żywieniu zwierząt, jak również zajmujące się oznaczaniem karotenoidów w różnych mieszankach i ekstraktach zawierających te istotne dla zdrowia ludzi i zwierząt związki. Należy również podkreślić, że jest to pierwsza opublikowana metoda umożliwiająca jednoczesne oznaczenie 15 karotenoidów z grupy karotenów i ksantofili.

O wadze dokonanych rozwiązań analitycznych przemawia fakt, że opracowana procedura została opublikowana w czasopiśmie wysoko punktowanym o współczynniku oddziaływania IF = 4,612:

**Mitrowska K.**, Vincent U., von Holst C. (2012) Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach. *Journal of Chromatography A* 1233, 44-53. (IF<sub>2012</sub> = 4,612; MNiSW<sub>2012</sub> = 40; Liczba cytowań = 1)

## Podsumowanie dorobku publikacyjnego<sup>5</sup>

Jestem autorem lub współautorem:

- 23 publikacji naukowych, z czego 17 powstało po doktoracie, w tym 5 prac stanowiących osiągnięcie. 19 artykułów opublikowanych zostało w czasopismach z bazy Journal Citation Reports (JCR),
- 5 rozdziałów w monografiach,
- 47 referatów lub komunikatów konferencyjnych, w tym 25 prezentowanych na konferencjach krajowych oraz 22 na konferencjach międzynarodowych.

**Sumaryczny IF** według listy JCR, zgodnie z rokiem opublikowania: **36,751** (z czego prace opublikowane po doktoracie = 27,012, w tym prace stanowiące osiągnięcie: 7,643);

**Liczba cytowań** publikacji według bazy Web of Science: **260** (249 bez autocytowań);

**Indeks Hirscha** według bazy Web of Science: **8**;

**Suma punktów MNiSW** = **429** (z czego prace opublikowane po doktoracie = 329, w tym prace stanowiące osiągnięcie = 112).

## 5b) Udział w projektach badawczych<sup>6</sup>

### **Międzynarodowych:**

- Projekt badawczy EC-JRC-IRMM nr 50177: Development of an analytical method for the determination of carotenoids in fish feed, 2008-2010, **główny wykonawca**;

### **Krajowych:**

- Projekt badawczy promotorski KBN nr 2 PO6K 007 29: Pozostałości zieleni malachitowej i jej metabolitów w tkankach ryb, 2005-2006, **główny wykonawca**;
- Projekt badawczy NCN nr NN 308-575540: Wpływ infekcji wywołanej przez *Actinobacillus pleuropneumoniae* na farmakokinetykę tkankową tulartromycyny u świń, 2011-2014, **wykonawca**;

<sup>5</sup> Szczegółowa analiza bibliometryczna zamieszczona jest w Załączniku 7 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

<sup>6</sup> Szczegółowy wykaz wszystkich projektów badawczych zamieszczono w Załączniku 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

- Projekt badawczy rozwojowy NCBiR nr NR 12-0127-10: Zwierzęta wolno żyjące jako wskaźnik zanieczyszczeń środowiskowych i ważny element strategii bezpieczeństwa żywnościowego kraju. Wolno żyjące ryby słodkowodne jako wskaźnik skażenia wód powierzchniowych lekami przeciwbakteryjnymi, 2011-2014, **wykonawca**;
- Projekt badawczy MNiSW „Iuventus Plus 2011” nr IP2011 036571: Opracowanie warunków analizy pozostałości nitroimidazoli w miodzie, 2012-2014, **kierownik**;
- Projekt badawczy NCN „Sonata 2” nr NCN 2011/03/D/NZ7/03767: Badanie możliwości przechodzenia sulfonamidów i nitroimidazoli z zanieczyszczonego wosku pszczelego do miodu, 2012-2015, **kierownik**.

### 5c) Nagrody za działalność naukową<sup>7</sup>

- Nagroda Wydziału Nauk Rolniczych, Leśnych i Weterynaryjnych z rekomendacji Komitetu Nauk Weterynaryjnych Polskiej Akademii Nauk dla zespołu: Posyński A., Żmudzki J., Mitrowska K., Niedzielska J. za cykl prac: „Opracowywanie metod oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych w tkankach zwierząt i żywności”, 2006;
- Nagroda Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk za najlepszą pracę doktorską z zakresu metrologii chemicznej. Tytuł pracy: „Pozostałości zieleni malachitowej i jej metabolitów w tkankach ryb”, 2007;
- Nagroda “Young Investigator Scholarship in Veterinary Medicine” przyznana przez Pfizer Animal Health dla obiecującego młodego naukowca za dotychczasowy dorobek naukowy i realizowane projekty badawcze, 2012;
- 5 nagród I stopnia i 2 nagrody II stopnia przyznanych przez Dyrektora PIWet-PIB w konkursach na najlepsze publikacje pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych, 2007-2013.

### 5d) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych<sup>8</sup>

#### **Międzynarodowych:**

- *International Symposium on Chromatography* (2004, 2012, 2014);
- *International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Analysis* (2006, 2014);
- *International Congress of The European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT)* (2006);
- *EuCheMS International Conference on Chemistry and the Environment* (2007) - **doniesienie ustne**;
- *International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis* (2007);
- *EuroResidue* (2008, 2012);
- *International Conference on Antimicrobial Agents in Veterinary Medicine* (2008);
- *International Symposium AOACI Europe Section with ASFILAB “New trends for pesticides and drug residues”* (2013);

<sup>7</sup> Szczegółowy wykaz i zakres uzyskanych nagród zamieszczono w Załączniku 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

<sup>8</sup> Szczegółowy wykaz konferencji oraz prezentowanych na nich referatów i doniesień naukowych zamieszczono w Załączniku 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

- *Informal Meeting on Mass Spectrometry* (2015);

**Krajowych:**

- *Forum Młodych Naukowców* (2004) - **doniesienie ustne**;
- *Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych* (2004, 2008, 2012);
- *Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Jakość w chemii analitycznej”* (2004, 2006);
- *Naukowa Konferencja Pszczelarska* (2005, 2006, 2007, 2008, 2012, 2014, 2015);
- *Polska Konferencja Chemii Analitycznej* (2005);
- *Konferencja Naukowa „Ochrona zdrowia w gospodarce rybackiej”*. Puławy, (2006) - **referat zamawiany**;
- *Konferencja Naukowa „Nowoczesne techniki badawcze w ocenie jakości produktów leczniczych”* (2006);
- *Konferencja Naukowa "Patologia ryb i raków oraz bezpieczeństwo żywności pochodzenia rybnego"* (2007) - **referat zamawiany**;
- *Conference of Polish Mass Spectrometry Society* (2008);
- *Krajowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego* (2008);
- *Konferencja Naukowa "Racjonalne stosowanie antybiotyków w weterynarii"* (2013);
- *Konferencja Naukowa "Perspektywy i możliwości zwalczania chorób ryb"* (2014) - **referat zamawiany**.

**5e) Udział w komitetach naukowych i organizacyjnych konferencji naukowych**

Jestem członkiem komitetu naukowego międzynarodowej konferencji EuroResidue VIII poświęconej najnowszym trendom w analizie pozostałości leków weterynaryjnych w żywności, która odbędzie się 23-25 maja 2016 r. w Egmond aan Zee, Holandia.

**5f) Członkostwo w towarzystwach naukowych**

- Członek Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego (od 2005);
- Członek Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (od 2007);
- Członek Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas (od 2007).

**5g) Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę**

Jestem zaangażowana w działalność referencyjną realizowaną w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB i od 2004 r. i w ramach tej aktywności, prowadzę szkolenia i opracowuję instrukcje dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej (ZHW).

Ponadto od 2006 r. prowadzę wykłady na temat urzędowej kontroli i występowania pozostałości syntetycznych i naturalnych barwników oraz nitroimidazoli w żywności pochodzenia zwierzęcego i paszach dla lekarzy weterynarii w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego (WCKP) w Puławach w ramach Specjalizacyjnego Studium Podyplomowego oraz dla Głównego Inspektoratu Weterynarii (GIW) w ramach Programu Wieloletniego 2014-2018, a także dla Powiatowych oraz Granicznych Inspektoratów Weterynarii.

W 2008 r. wystąpiłam jako młody pracownik nauki w filmie edukacyjnym promującym młodych naukowców w ramach programu GAPP (*Gender Awareness Participation Process: Differences in the choices of science careers*) realizowanego w obrębie 6 Programu ramowego Unii Europejskiej (FP6-SOCIETY).

Dodatkowo wygłosiłam 2 wykłady popularyzujące naukę:

- **Mitrowska K.:** Doświadczenia Stypendystki instytutu IRMM JRC. *Konferencja „Piękne oblicze nauki i biznesu”*, Kraków, 14-15.03.2011;
- **Mitrowska K.:** IRMM JRC – od pomysłu do realizacji. *Ogólnopolska Konferencja Doktorantów*, Warszawa, 10-12.06.2011.

### 5h) Opieka naukowa w charakterze promotora pomocniczego

Sprawuję opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego w otwartych przewodach doktorskich:

- lek. wet Krzysztofa Jazdzewskiego, tytuł rozprawy doktorskiej: „Występowanie pozostałości sulfonamidów w krajowym miodzie” (150. posiedzenie Rady naukowej PIWet-PIB, 30.11.2011);
- mgr. Tomasza Błądka, tytuł rozprawy doktorskiej: „Wpływ infekcji *Actinobacillus pleuropneumonie* na farmakokinetykę tkankową tulatromycyny u świń” (158. posiedzenie Rady naukowej PIWet-PIB, 26.06.2013).

### 5i) Odbyte staże, szkolenia i kursy naukowe

#### **Staż zagraniczne:**

- Instytut Materiałów Odniesienia i Pomiarów, Wspólnotowe Centrum Badawcze, Komisja Europejska (EC-JRC-IRMM), Geel, Belgia - dwuletni staż podoktorski, 16.09.2008-15.09.2010;

#### **Szkolenia i kursy międzynarodowe:**

- “FAO/IAEA Interregional training course on screening and confirmatory methodologies for veterinary drug residues”, The Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and the International Atomic Energy Agency (IAEA) through their Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Agriculture and Biotechnology Laboratory, Seibersdorf, Austria, 08-19.10.2004;
- „Analysis of chloramphenicol with Ridascreen Chloramphenicol kit”, R-Biopharm AG, Puławy, Polska, 12-13.06.2003;
- “The workshop on 'Pharmacokinetics”, The European College of Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT), Wrocław, Polska, 08-11.09.2004;
- “Training course: “Malachite green”, European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food, Fougères, Francja, 21-22.10.2004;
- „Oznaczanie zawartości substancji czynnych w paszach leczniczych metodą HPLC”, projekt Phare PL 01.04.05. Puławy, Polska, 14-17.12.2004.
- “Workshop on validation of screening methods”, European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food, Fougères, Francja, 02-03.06.2005.

- Francusko-polskie szkolenie w zakresie metod laboratoryjnych wykorzystywanych do wykrywania pozostałości substancji zabronionych, Ecole nationale des services veterinaires de Lyon, Puławy, Polska, 21-25.11.2005.
- „Wykrywanie i oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych metodami chromatografii i spektrometrii mas”, projekt Phare PL2003/004-379/04.01.03, Puławy, Polska, 29.05-02.06.2006.
- “Workshop on strategies for ATB – Group B1 confirmatory methods”, European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food, Fougères, Francja, 11-12.09.2006;
- “Methods of drug residues detection”, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise „Giuseppe Caporale”, Teramo, Włochy, 25.09-06.10.2006;
- “12th Summer Course on Pharmaceutical Analysis. Validation of analytical methods, regulatory and practical aspects”, The Auspices of the University of Florence and the Divisions of Analytical Chemistry and Pharmaceutical Chemistry of the Italian Chemical Society, Elba, Włochy; 26-27.09.2007;
- “The School for Advanced Residue Analysis in Food (SARAF)”, National Veterinary School of Nantes (ENVN), Nantes, Francja, 08-19.10.2007;
- “Workshop on proficiency testing studies: state of the art and Biocop WP8 fluoroquinolone session”, European Union Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food, Fougères, Francja, 25-27.06.2008;
- “Use of reference materials and estimation of measurement uncertainty”, EC-JRC-IRMM, Geel, Belgia, 06-07.10.2009;
- “Experimental design and data analysis”, prof. Y. Vander Heyden z Vrije Universiteit Brussel, EC-JRC-IRMM, Geel, Belgia, 03-04.02.2010;
- “ISO 17025”, Peter Boder z Delft University of Technology, EC-JRC-IRMM, Geel, Belgia, 09-10.12.2010;
- “Risk assessment of microbial hazards in foods and animal health”, prof. Moez Sanaa z French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES), PIWet-PIB, Puławy, Polska, 03-07.10.2011;
- “(U)HPLC method development and quality-by-design”, Imre Molnar, Salzburg, Austria, 14.09.2014;
- Szkolenie z obsługi zestawu UPLC firmy Waters, Geel, Belgia, 2009;

**Szkolenia i kursy krajowe:**

- “Warsztaty na temat platformy Web of Knowledge 5”, Thomson Reuters, Puławy, 5.12.2011;
- „Statystyka w jakości – kurs podstawowy”, StatSoft Polska, Kraków, 22-23.03.2012;
- „QbD: planowanie doświadczeń jako narzędzie zapewnienia jakości produkowanych leków”, StatSoft Polska, Kraków, 19-21.06.2012;
- Szkolenia z obsługi zestawów LC i LC/MS/MS firm Varian, Shimadzu, Agilent i ABSciex, Puławy, 2005-2014;
- Szkolenia z zakresu zapewnienia systemu jakości badań, Puławy, 2004-2011.

