

# AUTOREFERAT

**dr n. wet. BARBARA WOŹNIAK**

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



**Puławy, 2016**

## 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
4 a)	Tytuł osiągnięcia naukowego będącego jednotematycznym cyklem publikacji.....	4
4 b)	Wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu.....	4
4 c)	Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	5
5.	Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych.....	28
5 a)	Pozostałe osiągnięcia naukowo badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych.....	28
5 b)	Osiągnięcia naukowo badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych.....	31
5 c)	Udział w projektach badawczych.....	36
5 d)	Nagrody za działalność naukową i inne.....	37
5 e)	Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych.....	37
5 f)	Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę.....	39
5 g)	Opieka naukowa w charakterze promotora pomocniczego.....	39
5 h)	Odbyte staże, szkolenia i kursy naukowe.....	40
5 i)	Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych.....	41
5 j)	Inna działalność.....	41

**1. Imię i nazwisko**

Barbara Woźniak

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

- 2008**      **doktor nauk weterynaryjnych;**  
Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy (PIWet-PIB)  
w Puławach  
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Chromatograficzna analiza pozostałości  
hormonalnych stymulatorów wzrostu w tkankach zwierzęcych”
- 1979**      **magister inżynier chemik**  
Politechnika Warszawska, Wydział Chemii

**3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych**

- |                                     |   |
|-------------------------------------|---|
| <b>01.01.2009</b> do chwili obecnej | Zakład Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB<br>w Puławach – adiunkt               |
| <b>02.01.2007- 01.01.2009</b>       | Zakład Farmakologii i Toksykologii, PIWet-PIB<br>w Puławach – asystent              |
| <b>01.04.1987- 02.01.2007</b>       | Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego,<br>PIWet-PIB w Puławach – asystent |
| <b>01.02.1986- 01.04.1987</b>       | Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego,<br>PIWet-PIB w Puławach – chemik   |

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

**Na osiągnięcie naukowe składa się 7 publikacji, których sumaryczna punktacja przedstawia się następująco:**

Współczynnik wpływu (IF): **15,876**

(wg Thompson Reuters Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania)

Liczba punktów według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW): **200**

(zgodnie z rokiem opublikowania)

Liczba cytowań wg bazy Web of Science z dnia 24.02.2016: **33**

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

„Zastosowanie chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas do badań pozostałości związków o działaniu anabolicznym w moczu i tkankach zwierząt rzeźnych oraz żywności pochodzenia zwierzęcego”

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

- H1 Woźniak B.**, Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.: LC-MS/MS fast analysis of androgenic steroids in urine. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403, 2965-2972 (IF<sub>2012</sub>= 3,659; MNiSW<sub>2012</sub>=35; Liczba cytowań=7)

*Udział własny: opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie części oznaczeń analitycznych, interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji - 75%.*

- H2 Matraszek-Żuchowska I., Woźniak B\*.**, Żmudzki J.: Determination of zeranol, taleranol, zearalanone,  $\alpha$ -zearalenol,  $\beta$ -zearalenol and zearalenone in urine by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2013, 30, No. 6, 987-994. (IF<sub>2013</sub>= 2,22, MNiSW<sub>2013</sub>=30; Liczba cytowań=6)

*Udział własny: kierowanie projektem obejmującym badania, opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, interpretacja wyników, współudział w napisaniu manuskryptu i wykonaniu korekty po recenzji - 65%.*

*\*autor korespondencyjny*

- H3 Woźniak B.**, Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.: Determination of stilbenes and resorcylic acid lactones in bovine, porcine and poultry muscle tissue by liquid chromatography-negative ion electrospray mass spectrometry and QuEChERS for sample preparation. *Journal of Chromatography B*, 2013, 940, 15-23. (IF<sub>2013</sub>= 2,694; MNiSW<sub>2013</sub>=35; Liczba cytowań=3)

*Udział własny: opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie części oznaczeń analitycznych, analiza danych i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji - 75%.*

- H4 Woźniak B.**, Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J., Jedziniak P., Korycińska B., Sielska K., Witek S., Kłopot A.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry with ion trap and triple quadrupole analyzers for determination of thyreostatic drugs in urine and muscle tissue. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 700, 155-166 (IF<sub>2011</sub>= 4,555, MNiSW<sub>2011</sub>=40; Liczba cytowań=12)

*Udział własny: opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie części oznaczeń analitycznych, analiza danych i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji - 70%.*

- H5 Woźniak B.**, Witek S., Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.: Determination of the thyreostats in animal feeding stuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 2014, 58, 413-419. (IF= 0,365 MNiSW<sub>2014</sub>=15; Liczba cytowań=1)

*Udział własny: opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie obliczeń, analiza danych i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji - 80%.*

- H6 Woźniak B., Witek S., Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.:** Development and Application of LC-MS/MS Method for the Detection of Naturally Occurring Thiouracil in Milk Samples. *Food Analytical Methods*, 2014, 7, 1588–1597. (IF<sub>2014</sub>= 1,969) MNiSW<sub>2014</sub>=25; Liczba cytowań=0)

*Udział własny: opracowanie koncepcji pracy, zaplanowanie doświadczeń, wykonanie części oznaczeń analitycznych, obliczeń, analiza danych i interpretacja wyników, sformułowanie wniosków, napisanie manuskryptu, wykonaniu korekty po recenzji - 80%.*

- H7 Woźniak B., Witek S., Żmudzki J., Kłopot A.:** Natural occurrence of thiouracil in urine of livestock in Poland, *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 2012, 56, 611-615 (IF<sub>2011</sub>= 0,414, MNiSW<sub>2011</sub>=20; Liczba cytowań=4)

*Mój wkład w powstanie publikacji polegał na opracowaniu koncepcji pracy, analizie danych, interpretacji wyników, sformułowaniu wniosków, napisaniu manuskryptu i wykonaniu korekty po recenzji. Mój udział szacuję na 80%.*

---

<sup>1)</sup> Oświadczenia o indywidualnym wkładzie wszystkich współautorów stanowią Załącznik 6 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.

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

##### **Wprowadzenie**

Rolnictwo, a w szczególności chów zwierząt rzeźnych jest bardzo ważną częścią aktywności gospodarczej. Obecne tendencje w produkcji zwierzęcej to uzyskiwanie możliwie największych zysków przy minimalnych nakładach. Spośród wielu znanych czynników, które w istotny sposób wpływają na efektywność hodowli zwierząt rzeźnych, wyjątkową pozycję zajmują anaboliki, czyli związki chemiczne stymulujących syntezę białka w organizmie. Dotychczas największe znaczenie posiadają związki anaboliczne pochodzenia hormonalnego, które w różnym stopniu były i są wykorzystywane do intensyfikacji tuczu zwierząt [1].

Najliczniejsza grupa to hormony steroidowe używane w produkcji zwierzęcej od ponad 60 lat [2, 3]. Zalicza się do nich naturalne hormony płciowe należące do estrogenów, androgenów i gestagenów, ich syntetyczne pochodne oraz grupę związków klasyfikowanych obecnie, jako endogenne, a przez wiele lat uznawane za ksenobiotyki np. 19-nortestosteron i boldenon [4]. Właściwości anaboliczne wykazują również nieposiadające budowy steroidowej, a wykazujące powinowactwo do receptorów estrogenowych hormony syntetyczne np. stilbeny lub półsyntetyczny zeranol [5, 6]. Wśród substancji anabolicznych

stosowanych w tuczu bydła ważną pozycję zajmowały tyreostatyki - leki hamujące wydzielanie hormonów tarczycy i powodujące zwiększenia masy ciała zwierząt głównie poprzez wzrost retencji wody w organizmie [7].

Stosowanie hormonalnych stymulatorów w produkcji zwierząt rzeźnych od lat budzi szereg kontrowersji w wielu środowiskach. Zwolennicy stosowania hormonów w produkcji zwierzęcej, w tym producenci żywności, kładą nacisk na duże korzyści ekonomiczne i dowodzą, że podawanie anaboliów zwierzętom w sposób kontrolowany eliminuje ryzyko występowania pozostałości w stężeniach powyżej określonego bezpiecznego poziomu. W wielu krajach np. w USA, Kanadzie, Australii, Nowej Zelandii, Brazylii używanie w produkcji bydła mięsnego i mlecznego preparatów hormonalnych opartych głównie na hormonach naturalnych i ich pochodnych jest powszechne. Przeciwnicy stosowania hormonów dowodzą, że istnieje ryzyko dla zdrowia konsumenta wynikające z obecności pozostałości tych związków w żywności. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) zajmowała się toksycznością hormonów i w wielu dokumentach potwierdziła, że istnieje wystarczająca liczba dowodów świadczących o kancerogenności syntetycznego dietylostilbestrolu ( IARC.6,1974, IARC V.21, 1979, IARC S.7, 1987) jak też naturalnego 17  $\beta$ - estradiolu u zwierząt i człowieka. Dlatego też, dietylostilbestrol i estrogeny zostały zaliczone przez IARC do grupy 1 - związków kancerogennych dla człowieka (IARC 1979, 1987, 1999), androgenne anaboliki klasyfikowane są, jako substancje o prawdopodobnej kancerogenności dla człowieka (grupa 2A), natomiast gestageny umieszczone są w grupie 2B (IARC 1979, 1987) obejmującej substancje potencjalnie rakotwórcze dla człowieka. Również z inicjatywy Komisji Europejskiej podjęto szereg badań dotyczących toksyczności poszczególnych hormonów, a wyniki przedstawione zostały między innymi w dwóch raportach Komitetu Naukowego SCVPH (The Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health) omawiających potencjalne ryzyko dla zdrowia konsumenta wynikające z obecności pozostałości hormonów w mięsie i produktach mięsnych pochodzących od bydła [8, 9]. Rezultaty przeprowadzonych badań dały podstawy do sformułowania wniosków, z których wynika, że obecność hormonów w żywności pochodzenia zwierzęcego może niekorzystnie wpływać na zdrowie człowieka zarówno przez inicjowanie mechanizmów rakotwórczych jak i zaburzenia pracy układu endokrynnego. Dane ze wspomnianych raportów jak i późniejsze prace [10, 11] wskazują, że grupę szczególnego ryzyka stanowią dzieci, ponieważ poziom fizjologiczny hormonów płciowych jest u nich bardzo niski, a każda dodatkowa dawka hormonów dostarczona z pożywieniem, nawet w bardzo małych ilościach, może mieć negatywny wpływ na organizm dziecka. Dlatego biorąc pod uwagę dobro konsumenta, publiczna uwaga wciąż zwrócona jest na problem pozostałości hormonów w mięsie i produktach pochodzenia zwierzęcego.

W krajach Unii Europejskiej używanie hormonalnych stymulatorów wzrostu w produkcji zwierząt rzeźnych jest zabronione od 1988 roku [12, 13, 14]. Dopuszcza się jedynie stosowanie niektórych związków hormonalnych w celach terapeutycznych i zootechnicznych. Skutkiem wprowadzonego zakazu jest obowiązek prowadzenia systematycznej kontroli pozostałości związków anabolicznych w tkankach zwierząt rzeźnych i żywności pochodzenia zwierzęcego przez kraje UE i kraje eksportujące żywność do Europy.

Od roku 1996 zasady badań kontrolnych ukierunkowane na wykrywanie zagrożeń dla zdrowia człowieka zostały określone w Dyrektywie Rady 96/23/WE [15]. Zgodnie z nimi w wykazie substancji wykazujących działanie anaboliczne, których kontrola jest obligatoryjna są: stilbeny (A1), tyreostatyki (A2), steroidy (A3) oraz laktony kwasu rezorcyłowego w tym zeranol (A4). W Polsce każdego roku wykonuje się badania około 7000 próbek biologicznych pochodzenia zwierzęcego w kierunku obecności związków hormonalnych należących do grup A1 - A4. W ostatnich 5 latach w moczu świń i bydła wykrywano obecność 19-nortestosteronu, boldenonu oraz tiouracylu (próbki niezgodne), a ich odsetek mieścił się w granicach 0,08% - 0,17%. Z ostatniego raportu EFSA za 2013 rok [16] wynika, że spośród zbadanych 102 095 próbek w krajach UE w kierunku związków z grup A1 - A4 odnotowano 142 próbki niezgodne (0,14%). Najczęściej stwierdzano obecność tiouracylu (TU) należącego do tyreostatyków (73 próbki niezgodne), 19-nortestosteronu, boldenonu, testosteronu i trenbolonu z grupy steroidów (35 próbek), oraz laktony kwasu rezorcyłowego (31 próbek). Pozostałości wykrywano głównie u bydła (71% próbek niezgodnych) i trzody (21%), pojedyncze przypadki dotyczyły owiec, koni, drobiu i królików. Za główną przyczynę obecności tiouracylu i steroidów w badanych próbkach uznano ich endogenne pochodzenie, a nie nielegalne podawanie.

Zakaz stosowania hormonalnych stymulatorów wzrostu oznacza, że ich pozostałości nie mogą być obecne w próbkach biologicznych pochodzenia zwierzęcego i z tego powodu nie wyznaczono dla nich maksymalnych dopuszczalnych poziomów pozostałości (MRL). Minimalny wymagany poziom oznaczania (MRPL- *ang. minimum required performance limit*), określony został przez Komisję Europejską jedynie dla octanu medroksyprogesteronu [17]. Dlatego, w celu ujednoczenia zasad kontroli pozostałości Unijne Laboratoria Referencyjne w 2007 roku określiły tzw. „stężenia rekomendowane” (*ang. recommended concentration – RC*), które dla hormonalnych stymulatorach wzrostu mieszczą się w zakresie od  $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$  do  $10 \mu\text{g L}(\text{kg})^{-1}$  [18].

Sytuacja komplikuje się w odniesieniu do hormonów naturalnych oraz posiadających status pseudo endogennych, ponieważ do chwili obecnej nie ma ścisłych kryteriów oceny wyniku badań. Metoda GC-IRMS (*ang. isotope ratio mass spectrometry - IRMS*)

umożliwiająca odróżnienie natury endogennej od egzogennej estradiolu i testosteronu, oparta na wyznaczaniu stosunków izotopowych węgla  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  ma wciąż ograniczony zakres z powodu zbyt wysokich limitów detekcji i dostępności aparatury.

Innym rozwiązaniem tego problemu jest przeprowadzenie badań epidemiologicznych i wyznaczenie wartości progowej (*ang. threshold value*) dającej podstawę do kwalifikacji wyniku z dużym, określonym prawdopodobieństwem [19], jednak w przypadku zbyt małej liczby wyników niezgodnych (np. boldenon) ten sposób nie jest możliwy. Rozpoznanie czy hormon ma charakter egzogeny czy jest naturalnego pochodzenia można dokonać na podstawie znajomości markerów metabolitów, których dotychczas poznano tylko kilka [4].

Skuteczna kontrola pozostałości anabolików w różnego rodzaju matrycach jest możliwa tylko wtedy, gdy w badaniach stosowane są nowoczesne metody analityczne spełniające aktualne kryteria dotyczące czułości jak i sposobów detekcji.

Wymagania dla metod stosowanych w badaniach pozostałości zostały określone w Decyzji Komisji 2002/657/WE, w której szczególny nacisk położono na kryteria identyfikacji dla związków niedozwolonych [20]. Metody do badań związków anabolicznych muszą być oparte o techniki chromatograficzne połączone ze spektrometrią mas, która daje obraz struktury badanych związków i umożliwia ich prawidłową identyfikację. Ciągły rozwój detektorów spektrometrii mas spowodował ogromny postęp w możliwościach analitycznych aparatów. Szacuje się, że na przestrzeni lat 1997-2004, osiągnięto 1000-krotne obniżenie limitu detekcji dla metod opartych na chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas (LC-MS) oraz 100-krotne dla techniki chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS) [21].

Dla hormonalnych stymulatorów wzrostu nie ma znormalizowanych metod badań, dlatego poszczególne kraje i laboratoria mogą szybko reagować na nowe wyzwania w dziedzinie analityki uwzględniając swoje potrzeby i możliwości. Doskonalenie istniejących i opracowywanie nowych metod analitycznych jest koniecznością i ciągłym wyzwaniem, nie tylko ze względu na intensywny postęp w technikach analitycznych, ale również z powodu odkryć i osiągnięć w naukach biologicznych, medycznych i weterynaryjnych dotyczących np. metabolomiki. Zaleca się ponadto, aby limity detekcji dla grupy związków niedozwolonych były jak najniższe (*ALARA, as low as reasonably achievable*) [22]. Dlatego w wielu ośrodkach naukowych prowadzących badania pozostałości podejmowane są prace mające na celu rozwój metod analitycznych w oparciu o najnowsze osiągnięcia, dostępne publikacje naukowe, zalecenia Wspólnotowych Laboratoriów Referencyjnych oraz wiedzę i doświadczenie.

W badaniach pozostałości obok prawidłowo dobranej techniki detekcji, nie mniej ważne jest odpowiednie przygotowanie próbki do badań. Analiza ilościowa hormonów może



być utrudniona przez interferencje pochodzące od endogennych składników matrycy, które zwykle są obecne w próbkach biologicznych w stężeniach znacznie wyższych niż badany analit. Dlatego właściwy wybór matrycy i prawidłowo przeprowadzona optymalizacja przygotowania próbki, której podstawą jest dobra znajomość fizyko-chemicznych właściwości analitów, jest kluczem do sukcesu w analizie pozostałości.

Zgodnie z Decyzją Komisji 2002/657/WE metody stosowane w krajowym programie kontroli pozostałości muszą być zwalidowane, czyli poddane procesowi potwierdzenia, pozwalającego na uzyskanie obiektywnego dowodu, że metoda jest odpowiednia do założonego celu. W trakcie walidacji wyznaczane są parametry takie jak: specyficzność, liniowość, poprawność, powtarzalność i odtwarzalność, limit decyzyjny ( $CC\alpha$ ), zdolność wykrywania ( $CC\beta$ ), odporność oraz niepewność, które muszą spełniać określone kryteria. Dla metod stosowanych do celów potwierdzających sprecyzowano dodatkowe wymagania, takie jak konieczność uzyskania czterech punktów identyfikacyjnych (IP), oraz zgodność względnej intensywności jonów diagnostycznych (ang. *ion ratios*), w próbce badanej, z próbką odniesienia, z dopuszczalną tolerancją. Metoda powinna też być zweryfikowana w badaniach biegłości lub porównaniach międzylaboratoryjnych, które potwierdzą, że wyniki uzyskiwane przy jej użyciu są wiarygodne i porównywalne z wynikami otrzymywanymi przez inne laboratoria. Jest to warunek konieczny do tego, aby procedura mogła być akredytowana zgodnie z normą PN-EN ISO/IEC 17025 i wdrożona do badań urzędowych [23].

Stosowane w badaniach pozostałości hormonów anabolicznych, metody chromatografii gazowej z pojedynczą spektrometrią mas (GC-MS) spełniają wymagania odnośnie limitów detekcji, natomiast jak wykazało kilkuletnie doświadczenie, nie zawsze spełniają kryteria potwierdzające, co znacznie ogranicza ich przydatność do tych celów. Dlatego muszą być zastąpione metodami wyższej klasy, zgodnymi z aktualnymi osiągnięciami w zakresie technik detekcji. Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas (MS/MS), umożliwi zwiększenie czułości metod analitycznych i ułatwi potwierdzanie obecności związków niedozwolonych, zgodnie z obowiązującymi kryteriami.

Zakład Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB w Puławach z racji pełnienia funkcji Krajowego Laboratorium Referencyjnego jest odpowiedzialny za opracowywanie nowych, nowoczesnych metod analitycznych gwarantujących wysoki poziom badań prowadzonych w Polsce. O randze metod przeznaczonych do badań pozostałości związków anabolicznych pochodzenia hormonalnego świadczy fakt, że spośród około 30 000 próbek analizowanych pod kątem obecności kilkudziesięciu leków weterynaryjnych i zanieczyszczeń środowiskowych, ponad 7000 badanych jest w kierunku związków anabolicznych.

## Cel pracy

- Rozwój potwierdzających metod analitycznych z zastosowaniem tandemowej spektrometrii mas do badań pozostałości związków anabolicznych w moczu i tkankach zwierząt rzeźnych oraz żywności pochodzenia zwierzęcego;
- Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania tiouracylu w moczu zwierząt rzeźnych w Polsce i określenie wartości progowej stężenia dla tego związku.

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

### (H1) Metoda LC-MS/MS do oznaczania androgennych hormonów steroidowych w moczu zwierząt rzeźnych

Badania hormonów anabolicznych prowadzone są w Polsce od 1990 roku [24]. Początkowo stosowano metody analityczne dostosowane do możliwości aparaturowych zakładu, czyli kolejno chromatografię cienkowarstwową, metodę immunoenzymatyczną ELISA, chromatografię cieczową z detektorem diodowym oraz chromatografię gazową z detektorem wychwytu elektronów. Po wprowadzeniu Decyzją Rady 2002/657/WE szczególnych wymagań dotyczących metod stosowanych w badaniach związków zakazanych, tzn. konieczności potwierdzeń technikami chromatograficznymi sprzężonymi ze spektrometrią mas, w 2003 roku wprowadzono do badań chromatografię gazową ze spektrometrią mas, co było m. innymi przedmiotem mojej pracy doktorskiej.

Mimo, że metoda ta spełnia wymagania odnośnie wymaganych limitów detekcji, to nie zawsze sprawdza się, jako metoda potwierdzająca. Powodem są rygorystyczne kryteria dla metod potwierdzających opartych o technikę GC-EI-MS, szczególnie trudne do spełnienia dla niskich wartości stężeń rzędu  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Dlatego konieczne okazało się wprowadzenie do badań metod wyższej klasy, zgodnych z aktualnymi osiągnięciami w zakresie technik detekcji. Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas, umożliwia zwiększenie czułości metod analitycznych i ułatwia potwierdzanie obecności anabolików, zgodnie z obowiązującymi kryteriami znacznie poniżej  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  [22, 25].

Ponieważ w prowadzonych badaniach kontrolnych najczęściej stwierdzano androgenne hormony steroidowe - 19-nortestosteron i boldenon, dlatego w pierwszej kolejności podjęto się opracowania wieloskładnikowej metody potwierdzającej obejmującej oznaczanie jedenastu androgenów w moczu zwierząt rzeźnych, a wyniki pracy przedstawiono w publikacji H1.

W badaniach wykorzystano chromatografię cieczową sprzężoną z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Na korzyść wyboru tej techniki przemawiały trzy fakty, pierwszy to brak uniwersalnego czynnika do derywatywacji hormonów steroidowych oznaczanych metodą chromatografii gazowej, drugi to problemy związane z rozdziałem izomerów niektórych związków np.  $\alpha$  i  $\beta$ - boldenonu, na standardowych kolumnach stosowanych w chromatografii gazowej, a ostatni, to nowe możliwości analityczne, jakie oferuje chromatografia cieczowa dzięki postępowi w rozwoju detektorów i faz stacjonarnych.

W pierwszym etapie ustalono warunki pracy tandemowego spektrometru mas. W oparciu o dane piśmiennictwa zastosowano pozytywną jonizację przez elektrorozpraszanie (ESI – ang. *electrospray ionization*), zbieranie danych spektralnych prowadzono w trybie MRM. Optymalne warunki pracy dla potrójnego kwadropolowego spektrometru mas (QqQ) były wyznaczone w trakcie dozowania do aparatu roztworów poszczególnych analitów i ich deuterowanych standardów wewnętrznych. Dla każdego związku zidentyfikowano jon macierzysty i co najmniej dwa jony fragmentacyjne, konieczne do potwierdzenia obecności analitu zgodnie z Decyzją 2002/657/WE. W trakcie optymalizacji parametrów pracy źródła jonów wyznaczono napięcie kapilary, wartość potencjału deklasterującego, temperaturę i natężenia przepływu gazu rozpylającego, osłonowego i kolizyjnego oraz energię kolizji. Porównano też składy fazy ruchomej w celu uzyskania najkorzystniejszej jonizacji badanych związków. Do rozdziału chromatograficznego steroidów zastosowano innowacyjną kolumnę wyprodukowaną w technologii „core-shell” o średnicy ziaren 2,7  $\mu\text{m}$ , umożliwiającą doskonałą separację badanych związków, w tym epimerów  $\alpha$ - i  $\beta$ -trenbolonu oraz  $\alpha$ - i  $\beta$ -boldenonu, uzyskanie symetrycznych pików oraz trzykrotne skrócenie czasu analizy w porównaniu z kolumną standardową o ziarnach 5  $\mu\text{m}$ . Prawidłowy rozdział uzyskano z wykorzystaniem fazy ruchomej składającej się z mieszaniny metanolu z wodą w warunkach elucji izokratycznej w temperaturze 40°. Jest to jedna z pierwszych prac, w której opisano użycie tego rodzaju kolumny w badaniach steroidów.

Większość hormonów wydalanych jest w formie sprzężonej z kwasem glukuronowym lub siarkowym, dlatego w pierwszej kolejności próbka poddawana jest hydrolizie enzymatycznej w celu przeprowadzenia związku do formy macierzystej.

Do izolowania hormonów z próbek moczu zastosowano ekstrakcję do fazy stałej na kolumnkach C18, ograniczając zużycie odczynników organicznych. W badaniach optymalizacyjnych koncentrowano się na doborze rozpuszczalników skutecznych w usuwaniu związków interferujących, pochodzących w matrycy. Prawidłowe oczyszczanie ekstraktów uzyskano po zastosowaniu kolejno ekstrakcji ciecz-ciecz z n-pentanem oraz kolumnki aminowej, o czym świadczy brak pików zakłócających w próbkach ślepych moczu oraz eliminacja efektu matrycy.

Opracowana procedura została poddana walidacji, w trakcie której dla każdego analitu wyznaczono wszystkie wymagane parametry metody. Metoda cechuje się dobrą liniowością ( $r^2 > 0,99$ ), jest specyficzna i dokładna. Odzysk związków z próbek moczu mieści się w przedziale 76% - 118% przy współczynniku zmienności w warunkach powtarzalności i odtwarzalności mniejszym niż 15% i 25%. Analizę ilościową przeprowadzano w oparciu o deuterowane wzorce wewnętrzne, co pozwoliło wyeliminować zarówno straty na etapie przygotowania próbki jak i zmienność efektywności jonizacji. Wyznaczone wartości limitu decyzyjnego metody, nie przekroczyły  $0,2 \mu\text{g L}^{-1}$  i były 5-krotnie i 10-krotni niższe od stężeń rekomendowanych dla tej grupy związków. Wiarygodność tak niskich wartości krytycznych metody sprawdzono wykonując badania 20 próbek fortyfikowanych do stężeń CC $\alpha$  i potwierdzając poprawny odzysk i precyzję metody na tym poziomie. Badania odporności metody potwierdziły brak wpływu niewielkich, niezamierzonych zmian czynników zewnętrznych na jej sprawność oraz przydatność do badań próbek moczu pobranych zarówno od bydła jak i świń. Ponieważ opracowana procedura dedykowana jest do celów potwierdzających, wykazano, że w całym zakresie badanych stężeń dla wszystkich analitów spełnione są kryteria potwierdzające dotyczące zarówno czasów retencji jak i intensywności jonów fragmentacyjnych.

Opracowana procedura potwierdzająca obejmuje 11 związków steroidowych zarówno syntetycznych i naturalnych, w tym  $17\beta$ -1-testosteron i  $17\alpha$ -1-testosteron, których sposoby oznaczania opisano w bardzo nielicznych publikacjach [26]. Metodę cechuje czułość, selektywność, prostota przygotowania próbek oraz krótki czas analizy. Jest to jedna z pierwszych procedur, w której zastosowano innowacyjną kolumnę Poroshell do rozdzielenia  $\alpha$ - i  $\beta$ - epimerów steroidów.

Procedura oznaczania androgenów w moczu zwierząt rzeźnych została trzykrotnie pozytywnie zweryfikowana w międzynarodowych badaniach biegłości organizowanych przez EURL ds. hormonalnych promotorów wzrostu, w RIKILT Wageningen w Holandii (Raporty 2012.501; 2013.501) oraz przez Central Science Laboratory w Wielkiej Brytanii w ramach programu FAPAS (Raport 02184). Zarówno wyniki walidacji jak i badań biegłości potwierdziły wiarygodność i przydatność metody do założonych celów. Metoda poddana została procesowi akredytacji i wdrożona do badań w ramach Krajowego programu badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego zarówno w laboratorium PIWet-PIB w Puławach jak i w laboratoriach ZHW uczestniczących w tym programie. Rokrocznie w PIWet-PIB przy użyciu tej procedury badanych jest ponad 100 próbek moczu przysyłanych w ramach krajowego programu i kilkanaście próbek wymagających potwierdzenia, w których w laboratoriach regionalnych metodami

skryningowymi wykryto obecność hormonów. Z zastosowaniem prezentowanej metody w ciągu 4 lat w 21 próbkach moczu potwierdzono obecność  $17\beta$ -nortestosteronu, a w 9 próbkach - boldenonu. Na szczególną uwagę zasługuje fakt stwierdzenia w próbkach moczu pobranych od świń zarówno formy  $\alpha$ - jak i formy  $\beta$ - boldenonu w formie wolnej i skoniugowanej, ponieważ dotychczas nie opisano takiego przypadku w literaturze.

Należy podkreślić, że przedstawiona praca cieszy się dużym zainteresowaniem i ma wpływ na rozwój nauki, o czym świadczy rosnąca liczba cytowań (7).

## **(H2) Metoda oznaczania laktonów kwasu rezorcylowego w moczu zwierząt rzeźnych**

Kolejnym przedsięwzięciem było opracowanie metody potwierdzającej do oznaczania laktonów kwasu rezorcylowego (RALs) w moczu zwierząt rzeźnych. Do tej grupy związków zalicza się zeranol - niesteroidowy związek o właściwościach estrogennych wykazujący właściwości anaboliczne, jego metabolity taleranol i zearalanon oraz mikotoksynę zearalenon i jej dwa metabolity  $\alpha$ - i  $\beta$ -zearalenol. Pojawiające się w piśmiennictwie światowym doniesienia o tym, że u niektórych gatunków zwierząt może dochodzić do powstawania endogennego zeranolu i jego głównego metabolitu taleranolu, na skutek przemian metabolicznych zearalenonu - mikotoksyny produkowanej przez różne gatunki *Fusarium*, a obecnej w paszach, miały duży wpływ na prowadzenie kontroli pozostałości zeranolu w tkankach zwierząt rzeźnych. W świetle tych informacji do odróżnienia czy zeranol stosowany był nielegalnie, czy jego obecność w próbce jest wynikiem zanieczyszczenia paszy mikotoksyną, konieczne jest badanie całej grupy laktonów i określenie ich wzajemnej zależności.

Ponieważ dotychczas nie dysponowano metodą umożliwiającą detekcję wszystkich wymienionych związków jednocześnie, zaistniała konieczność opracowania stosownej procedury analitycznej z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas, która powinna też spełniać kryteria dla metod potwierdzających.

Badania rozpoczęto od optymalizacji warunków pracy tandemowego spektrometru mas poprzez dozowanie roztworów wzorcowych poszczególnych analitów oraz ich deuterowanych analogów (IS) w celu uzyskania dobrej fragmentacji związków oraz zadowalającej czułości. Ustalono takie parametry pracy źródła jonów jak: temperatury i natężenia przepływu gazów, napięcia rozpylania oraz potencjału fragmentacyjnego i wejściowego. W analizie MS/MS zastosowano negatywną jonizację, zbieranie danych spektralnych prowadzono w trybie MRM. Dla każdego związku uzyskano co najmniej dwa jony potomne, spełniając tym samym kryterium wymagane dla metod potwierdzających. Prawidłowy rozdział chromatograficzny badanych związków uzyskano w odwróconym

układzie faz na kolumnie oktadecylowej C18 (ODS 3, 150 x 2,1 mm, 3 µm), stosując jako fazę ruchomą metanol z wodą.

Porównano dwie metody oczyszczania próbek moczu przed analizą LC-MS. W pierwszej, ekstrakcję analitów z moczu prowadzono eterem dietylowym, a następnie do oczyszczania i zagęszczania ekstraktu stosowano kolumnienki C18 i NH<sub>2</sub>. W drugiej metodzie, w celu wyeliminowania zużycia znacznej ilości rozpuszczalników organicznych posłużono się tylko ekstrakcją do fazy stałej na takich samych kolumnienkach, koncentrując się na doborze roztworów do przemywania kolumnienek i rozpuszczalników do elucji badanych związków. Czyste ekstrakty i poprawny odzysk analitów z próbek wzbogaconych moczu uzyskano dla metody pierwszej, w metodzie drugiej niektórych analitów nie stwierdzono na chromatogramach.

Procedura została zwalidowana zgodnie z obowiązującymi regulacjami i spełnia wszystkie wymagania analityczne określone dla metod potwierdzających przeznaczonych do oznaczania związków zakazanych w próbkach biologicznych pochodzenia zwierzęcego. Odzysk analitów z próbek moczu mieści się w przedziale 76% - 116%. Opracowana metoda cechuje się dobrą liniowością ( $r > 0,99$ ) i powtarzalnością, współczynnik CV nie przekracza 25%. Wyznaczone limity decyzyjne ( $CC\alpha$ ) dla poszczególnych związków wynoszą od 0,04 µg L<sup>-1</sup> do 0,18 µg L<sup>-1</sup>, a zdolność oznaczania ( $CC\beta$ ) od 0,07 µg L<sup>-1</sup> do 0,31 µg L<sup>-1</sup> i są znacznie niższe od rekomendowanego przez CRLs stężenia dla laktonów równego 2 µg L<sup>-1</sup>. Należy podkreślić, że tak niskie wartości limitów detekcji laktonów w próbkach moczu należą do nielicznych prezentowanych w literaturze.

Jednym z elementów walidacji było też badanie efektu matrycy (EM), który bardzo często występuje w analizie próbek biologicznych techniką LC-MS/MS. Efekt matrycy manifestuje się wzmocnieniem lub obniżeniem sygnału chromatograficznego analitów na skutek zmiany skuteczności jonizacji w źródle przez endogenne substancje pochodzące z próbki obecne w ekstrakcie końcowym [27]. Ponieważ wyznaczony efekt dla czterech związków przekraczał 30%, stężenia laktonów wyznaczano w oparciu o krzywą kalibracyjną matrycową, której zastosowanie jest jednym z sposobów eliminującym to niekorzystne zjawisko.

Opracowana procedura została dwukrotnie poddana sprawdzeniu w międzynarodowych badaniach biegłości, których organizatorami było Progetto Trieste we Włoszech (Progetto Trieste 2014, 2nd round – Veterinary Drug Residues) oraz EURL RIKILT w Wageningen (2015, Raport 2015.517 ) z pozytywnym wynikiem, co świadczy o jej wiarygodności. Po przejściu procesu akredytacyjnego metoda została wdrożona do krajowego programu badań kontrolnych pozostałości.

W trzech próbkach moczu przysłanych do potwierdzenia obecności zeranolu wykrytego metodą skryningową, suma stężeń mikotoksyny i jej metabolitów była ponad 30-krotnie wyższa niż suma stężeń zeranolu i jego metabolitów, co zgodnie z ustalonymi kryteriami wyraźnie wskazuje na naturalne pochodzenie zeranolu, wynikające z obecności mikotoksyny.

Zastosowanie opracowanej procedury w badaniach potwierdzających umożliwia przeprowadzenie prawidłowej interpretacji wyniku i określenie, czy obecność zeranolu w próbce jest wynikiem nielegalnego podawania czy zanieczyszczenia toksyną.

**(H3) Opracowanie metody LC-MS/MS oznaczania stilbenów i laktonów kwasu rezorcylowego w tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych z zastosowaniem techniki QuEChERS do przygotowania próbki**

W badaniu związków anabolicznych bardzo ważną rolę odgrywa właściwy wybór matrycy. Z reguły badane są próbki, w których prawdopodobieństwo występowania danego związku jest największe, ale też brana jest pod uwagę łatwość pobierania próbek, ich przechowywania czy też przygotowania [28]. Mimo, że w próbkach mięśni obserwuje się najniższe poziomy pozostałości hormonów, to często ta matryca jest materiałem badawczym. Wynika to faktu, że kontrolą pozostałości hormonów objęty jest również drób, od którego poubojowo pobierane są mięśnie, a także mięso przeznaczone na eksport i importowane z państw, gdzie stosowanie niektórych anaboliów w tuczu zwierząt jest dozwolone. Jednym z autoryzowanych w USA związków jest zeranol podawany zwierzętom w postaci implantu pod nazwą Ralgro. Dopuszczony, wyznaczony przez JECFA poziom pozostałości zeranolu w mięśniach bydła wynosi  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ , a w wątrobie  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  [8], natomiast zgodnie z przepisami Unii Europejskiej, zeranol nie powinien być obecny w tkankach zwierzęcych.

Dlatego podjęto się opracowania nowoczesnej metody do oznaczania i potwierdzania sześciu związków z grupy laktonów kwasu rezorcylowego i trzech związków z grupy stilbenów w tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z hybrydowym spektrometrem mas łączącym potrójny quadropol z pułapką jonową (QTRAP). Stilbeny, do których należą: dietylostilbestrol, dienestrol i heksestrol to syntetyczne, niesteroidowe estrogeny zakazane w tuczu zwierząt ze względu na kancerogenne właściwości, których kontrola jest obligatoryjna w krajach UE. Wyniki pracy zostały przedstawione w publikacji **H3**.

Zoptymalizowano warunki detekcji stilbenów ustalając parametry napięć na detektorze, przepływy gazów, temperaturę, monitorowane przejścia oraz skład fazy ruchomej

zapewniającej optymalną czułość metody. Dla laktonów kwasu rezorcylowego przyjęto wcześniejsze warunki detekcji przedstawione w pracy **H2**. W przeciwieństwie do większości hormonów steroidowych, te dwie grupy syntetycznych estrogenów posiadające w swojej strukturze grupę fenolową i z tego powodu zbliżone właściwości chemiczne, analizowane są przy zastosowaniu jonizacji negatywnej. Do rozdziału chromatograficznego badanych związków zastosowano oryginalną kolumnę Poroshell, co w porównaniu ze stosowaną dotychczas standardową kolumną ODS3 (**H2**), znacznie poprawiło separację trudnych do rozdziału związków  $\alpha$ -zearalenonu i zearalanonu posiadających te same przejścia chromatograficzne, oraz dietylostilbestrolu i dienestrolu-d2.

Kierując się aktualnymi trendami w przygotowaniu próbek biologicznych do analizy instrumentalnej, do ekstrakcji analitów z próbek mięśni zastosowano technikę QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), od kilku lat z powodzeniem używaną w analizie pestycydów, natomiast niewykorzystywaną dotychczas w badaniach związków anabolicznych. Oryginalna metoda QuEChERS polega na ekstrakcji i podziale w układzie ciecz–ciecz składników próbki z użyciem acetonitrylu, a następnie oczyszczeniu ekstraktu z wykorzystaniem metody dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (SPE). W trakcie optymalizacji procedury w pierwszej kolejności dokonano wyboru rozpuszczalnika do ekstrakcji analitów z próbek mięśni w obecności siarczanu magnezu i octanu sodu. Porównano przydatność acetonitrylu i octanu etylu i na podstawie odzysku badanych związków oraz czystości chromatogramów stwierdzono, że dla całej grupy badanych analitów, octan etylu daje lepsze wyniki. Skuteczną separację fazy organicznej i wodnej uzyskano przy wirowaniu ekstraktów przy szybkości 10 000 obr/min, przy mniejszej szybkości wirowania duża część fazy organicznej ulegała wchłonięciu przez pozostałe składniki.

Porównano skuteczność oczyszczania uzyskanego ekstraktu stosując przygotowane we własnym zakresie zestawy do dyspersyjnej SPE składające się z sorbentu C18, który eliminuje niepolarne zanieczyszczenia takie jak tłuszcze oraz siarczanu magnezu wiążącego obecną w ekstrakcie wodę, a także gotowy zestaw sorbentów zawierający dodatkowo PSA (primary secondary amine), która pozwala usuwać cukry i kwasy tłuszczowe. Komercyjny zestaw okazał się skuteczniejszy w usuwaniu zanieczyszczeń, ale nie wyeliminował całkowicie tłuszczu z ekstraktu, dlatego dodatkowo zastosowano dwukrotne odtłuszczenie n- heksanem. W efekcie uzyskano czyste ekstrakty dla mięśni różnych gatunków zwierząt. Świadczą o tym wyniki badania selektywności metody przeprowadzone na próbkach mięśni pobranych od kurcząt, gęsi, indyków, bydła, świń i daniela. Na chromatogramach w zakresie czasów retencji badanych związków, nie stwierdzano pików interferujących pochodzących z matrycy.



Walidację procedury wykonano zgodnie z ogólnymi wytycznymi Decyzji Komisji 2002/657/WE. Odzysk związków z próbek tkanki, skorygowany poprzez zastosowanie deuterowanych standardów wewnętrznych, zawierał się w przedziale 83% - 115%. Wartości rzeczywiste odzysku wynosiły około 32% dla stilbenów i od 50% do 70% dla laktonów kwasu rezorcylowego, a zaobserwowane różnice są wynikiem różnej polarności związków. Opracowana metoda cechuje się dobrą liniowością ( $r > 0,99$ ) i powtarzalnością, współczynnik CV nie przekracza 22%. Wyznaczone limity decyzyjne ( $CC\alpha$ ) i zdolność wykrywania ( $CC\beta$ ) dla poszczególnych związków są znacznie niższe ( $<0,23 \mu\text{g kg}^{-1}$ ;  $<0,4 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) od rekomendowanego stężenia wynoszącego  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Opracowana metoda spełnia obowiązujące kryteria dla metod potwierdzających stosowanych w badaniach związków zakazanych.

Jest to pierwsza opublikowana metoda, w której do ekstrakcji laktonów kwasu rezorcylowego z tkanki mięśniowej zastosowano technikę QuEChERS, której zaletą jest niewielkie zużycie odczynników chemicznych, w tym rozpuszczalników, co jest zgodne z koncepcją „zielonej chemii” (ang. *green chemistry*), prostota wykonania i redukcja kosztów analizy.

W pracy zaprezentowano też alternatywny do wymagań Decyzji 2002/657/WE sposób walidacji metody dla tkanki mięśniowej zwierząt rzeźnych. Ponieważ kontrola pozostałości substancji anabolicznych prowadzona jest u różnych gatunków zwierząt, zgodnie z wymaganiami, dla każdego gatunku powinna być przeprowadzona odrębna walidacja. W przeprowadzonych badaniach walidacyjnych, każda niezależna seria badań wykonana była na wzbogaconych próbkach tkanki mięśniowej pochodzących od różnych gatunków zwierząt (drób, bydło, świnie). W oparciu o uzyskane dane przeprowadzono analizę statystyczną z wykorzystaniem testów t-Studenta i F- Fishera-Snedecora mającą na celu sprawdzenie hipotezy, czy wyniki badania próbek wykonanych opracowaną metodą zależą od gatunku zwierząt. Przeprowadzona analiza wykazała, że gatunkowość tkanki mięśniowej nie miała istotnego wpływu na wynik analizy ilościowej, dlatego uśredniono wyniki parametrów walidacyjnych. Przedstawione rozwiązanie pozwala na trzykrotne zmniejszenie liczby badanych próbek w trakcie walidacji metody.

#### **(H4) Opracowanie metody chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas do oznaczania tyreostatyków w moczu i tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych**

Ważną pozycją w krajowym planie kontroli pozostałości w tkankach zwierząt rzeźnych jest analiza tyreostatyków. Jest to grupa leków różniących się budową chemiczną, których wspólną cechą jest blokada syntezy hormonów tarczycy, co sprzyja między innymi

procesom tuczu zwierzęcia. Dlatego tyreostatyki mogą być stosowane w celach anabolicznych w tuczu zwierząt rzeźnych, a szczególnie bydła. Dodatkowy przyrost masy ciała zwierząt jest rezultatem zatrzymania wody w tkance podskórnej i mięśniowej, a także w przewodzie pokarmowym [29], co znacznie obniża jakość mięsa, a pozostałości tyreostatyków w tkankach jadalnych zwierząt niosą ze sobą ryzyko dla zdrowia konsumentów, ponieważ należą do związków kancerogennych. Dla tych szczególnych powodów, od początku lat osiemdziesiątych obowiązuje zakaz ich stosowania w produkcji zwierzęcej (Dyrektywa Rady 81/602/EEC), a to oznacza zero tolerancji dla pozostałości. W wydanym w 2007 roku dokumencie, Europejskie Laboratoria Referencyjne zaleciły dla tej grupy związków tzw. „stężenie rekomendowane” równe  $10 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$ , co wobec ustalonego wcześniej MRPL wynoszącego  $100 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$  oznaczało dziesięciokrotne obniżenie limitu.

Dlatego kolejnym wyzwaniem było opracowania metody oznaczania pięciu związków tyreostatycznych: tapazolu, tiouracylu, metylotiouracylu, propylotiouracylu i fenylotiouracylu w moczu i tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych, spełniającej nowe wymagania, a wyniki pracy przedstawiono w publikacji **H4**.

W trakcie przygotowywania procedury skoncentrowano się na doborze warunków detekcji, sposobach oczyszczania próbek biologicznych, eliminacji efektu matrycy oraz sprawdzeniu przydatności nowej metody do celów potwierdzających. Ekstrakcja tyreostatyków z matryc biologicznych oraz ich analiza jest dużym wyzwaniem analitycznym. Pierwsza trudność to oddzielenie ich od składników matrycy, w której występują w różnych formach tautomerycznych, następną to uzyskanie prawidłowego rozdziału chromatograficznego na fazach odwróconych z powodu ich dużej polarności i ostatnia - niewystarczająca czułość spektrometrii mas w analizie tak małych cząsteczek (100–200 u). Dlatego zgodnie z najnowszymi doniesieniami literaturowymi tyreostatyki oznaczano w formie pochodnych po reakcji z bromkiem 3-jodobenzylu, w celu zwiększenia masy cząsteczki, zmiany jej polarności, poprawieniu jonizacji i stabilizacji form tautomerycznych [30].

W opracowanej procedurze zastosowano dwa sposoby detekcji, do celów skryningowych wykorzystano spektrometr mas FINNIGAN LCQ™ DUO (Termo Qest) z analizatorem jonów – pułapką jonową (IT, ang. *Ion trap*), natomiast w metodzie potwierdzającej spektrometr mas API 4000 z potrójnym kwadrupolem (QqQ, ang. *Triple quadrupole*). Warunki detekcji tyreostatyków na obydwu analizatorach wyznaczano poprzez indywidualne dozowanie na aparaty roztworów wzorców w formie pochodnych. W trakcie strojenia spektrometrów mas (tuning) stosowano i porównano skuteczność zarówno pozytywnej jak i negatywnej jonizacji oraz skład fazy ruchomej. Dla tiouracylu i jego pochodnych dla obydwu sposobów uzyskano poprawne wyniki, natomiast dla tapazolu tylko pozytywna jonizacja dawała satysfakcjonujące rezultaty. Dlatego, w procedurze zastosowano jonizację pozytywną, generującą intensywne

jony gwarantujące dobrą czułość metody, lecz o słabszej specyficzności, ponieważ wywodzące się z głównie z cząsteczki jodobenzylu. Jonizacja negatywa, nieprzydatna dla tapazolu, dawała bardziej specyficzne przejścia, ponieważ jony diagnostyczne pochodziły z cząsteczki tyreostatyków. Najlepsze wyniki w odniesieniu do warunków jonizacji, intensywności otrzymanych sygnałów oraz geometrii pików uzyskano dla fazy ruchomej składającej się z acetonitrylu z 0,1% kwasem octowym. Rozdział chromatograficzny związków prowadzono na kolumnie C18 stosując elucję gradientową z dużym przyrostem fazy organicznej.

Zaproponowano bardzo prostą i szybką metodę przygotowania próbek moczu przed analizą LC-MS/MS składająca się tylko z dwóch etapów, reakcji derywatywacji obecnych w próbce tyreostatyków i ekstrakcji uzyskanych pochodnych eterem dietylowym. Przeprowadzone badania wstępne wykazały, że zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej na kolumnkach krzemionkowych jak i ekstrakcji dyspersyjnej z użyciem tego samego sorbentu nie są skuteczne w eliminacji zanieczyszczeń, natomiast znacznie obniżają intensywności sygnałów chromatograficznych tyreostatyków, dlatego zostały wykluczone z etapu oczyszczania próbek.

W celu wyboru optymalnego rozpuszczalnika do ekstrakcji analitów z próbek tkanki mięśniowej, sprawdzono przydatność różniących się polarnością rozpuszczalników: eteru tert-butylo- metylowego, metanolu, octanu etylu i buforu Robinsona-Brittona.

Najkorzystniejsze okazało się połączenie metanolu z buforem, ponieważ oprócz prawidłowych odzysków, przy pH 8 łatwo uzyskano denaturację obecnych w próbce białek, których obecność powodowała supresję jonów i zaniżony odzysk dla propylotiouracylu i fenylotiouracylu. Jest to jedna z pierwszych prac, w której przeprowadzono szczegółową analizę przyczyn supresji jonów spowodowaną efektem matrycy i sposobu jej eliminacji.

Metoda została poddana walidacji zgodnie z obowiązującymi regulacjami. W pierwszej kolejności badania przeprowadzono na chromatografie cieczowym sprzężonym z pułapką jonową. Uzyskano poprawne, zgodne z obowiązującymi wymaganiami, wartości parametrów walidacyjnych: odzysku, powtarzalności i limitów detekcji. Jednak około 15-20% próbek nie spełniało kryteriów dla względnych intensywności jonów, wymaganych dla techniki tej techniki dla metod potwierdzających, dlatego metodę przeznaczono do celów skryningowych. Konieczne okazało się zastosowanie bardziej selektywnego sposobu detekcji, aby metoda mogła być używana do celów potwierdzających. Detektorem o znacznie lepszej selektywności jest potrójny kwadrupol, dlatego przeprowadzono ponowną walidację metody na aparacie API 4000 wyposażonym w ten analizator. Uzyskano prawidłowe wyniki zarówno dla limitów detekcji jak i powtarzalności. Limity decyzyjne dla poszczególnych analitów mieściły się w granicach 0, 84 -1,24  $\mu\text{g L}^{-1}$  dla próbek moczu i 0,72-2,16  $\mu\text{g kg}^{-1}$  dla próbek tkanki mięśniowej. Ponadto ponad 95% próbek badanych w trakcie badań

walidacyjnych spełniało kryteria potwierdzające. Opracowane metody – skryningowa i potwierdzająca zostały pozytywnie zweryfikowane w badaniach biegłości zorganizowanych przez Unijne Laboratorium Referencyjne w RIKILT w Wageningen w 2013 roku (Raport 2013.520) oraz w badaniach przeprowadzonych przez FAPAS w 2012 roku (Raport 02199), przeszły proces akredytacyjny i zostały wdrożone do badań kontrolnych pozostałości związków tyreostatycznych prowadzonych w PIWet-PIB w Puławach. W 2011 roku metodę potwierdzającą wdrożono do sześciu laboratoriów ZHW i przy jej użyciu bada się ponad 600 próbek moczu rocznie. Dwukrotne badania międzylaboratoryjne zorganizowane przez KLR PIWet-PIB w Puławach, w których wszyscy uczestnicy uzyskali wyniki zadowalające, potwierdziły, że opracowana metoda jest rzetelna i gwarantuje uzyskiwanie wiarygodnych wyników. Zastosowanie w rutynowych badaniach kontrolnych zaprezentowanej metody umożliwiło wykrycie, po raz pierwszy w Polsce, naturalnego tiouracylu w próbkach moczu zwierząt rzeźnych.

Według bazy danych WIPIMD journal, opublikowana metoda, od 2011 roku należy do dwudziestu cieszących się największym zainteresowaniem prac metodycznych dotyczących tematyki tyreostatyków i posiada obecnie 12 cytowań.

#### **(H5) Oznaczania tyreostatyków w paszy metodą LC-MS/MS**

Zgodnie z wytycznymi Dyrektywy 96/23/WE, w przypadku stwierdzenia wyniku niezgodnego istnieje konieczność przeprowadzenia przez Inspekcję Weterynaryjną dochodzenia wyjaśniającego, w trakcie którego pobierane są dodatkowe próbki do badań. Na poziomie gospodarstw, oprócz materiału biologicznego, wskazane jest pobranie próbek wody i paszy. Ponieważ tyreostatyki, w przeciwieństwie do hormonów steroidowych, są aktywne przy podawaniu *per os*, dysponowanie metodą umożliwiającą oznaczanie tych związków w paszy było warunkiem koniecznym do pełnej realizacji krajowego programu kontroli pozostałości. W prezentowanych dotychczas kilku pracach dotyczących tej matrycy, uzyskiwano limity detekcji tyreostatyków rzędu  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  i wyższe [30,31]

Dlatego podjęto się opracowania nowoczesnej, czulej, opartej o chromatografię cieczową sprzężoną ze spektrometrią mas metody, umożliwiającej oznaczanie całej tej grupy związków w próbkach paszy. Efekty pracy przedstawiono w publikacji **H5**. Punktem wyjściowym do przygotowania procedury oznaczania tyreostatyków w paszy była wcześniej opublikowana metoda przeznaczona dla próbek mięśni. Przyjęto wcześniej ustalone warunki detekcji tyreostatyków, natomiast poprawiono warunki rozdziału chromatograficznego. Zastąpienie kolumny Nucleosil® 100-5 C18 AB (125 mm x 2 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolumną Poroshell

120-EC C18 column (150 x 2,1mm, 2,7  $\mu\text{m}$ ) bardzo korzystnie wpłynęło na kształt i symetrię pików tyreostatyków, a w szczególności tapazolu, który zyskał również na intensywności. W dalszej kolejności skoncentrowano się na sposobie oczyszczania próbki. Sprawdzone skuteczność dwóch rozpuszczalników organicznych o różnej polarności (metanol, eter-tert-butylowo-metylowy) oraz mieszaniny metanol/ Britton-Robinson bufor do ekstrakcji analitów z próbek matrycy. Najskuteczniejszy okazał się metanol dający odzysk 97%. Ponieważ próbki paszy zawierają duże ilości tłuszczu i białka, etap odtłuszczania i denaturacji białek jest bardzo ważnym elementem oczyszczania próbki, posiadającym duży wpływ na efekt matrycy. Skuteczne usunięcie tłuszczu z ekstraktu metanolowego uzyskano stosując trzykrotną ekstrakcję ciec-ciecz z eterem naftowym. Niezależnie od rodzaju badanych próbek paszy, nie zaobserwowano strącania białek pod wpływem temperatury w ekstrakcie metanolowym, dlatego pominięto etap odbiałczania. Mimo czystych ekstraktów i braku interferencji na chromatogramach próbek ślepych matrycy, stwierdzono znaczne wzmocnienie sygnału tapazolu (EM, 70%), a obniżenie sygnału fenylotiouracylu (EM, -59%). Dlatego analizę ilościową związków tyreostatycznych prowadzono w oparciu o krzywą kalibracyjną matrycową, której zastosowanie jest jednym ze sposobów eliminowania efektu matrycy.

Opracowana procedura charakteryzuje się wysoką czułością, poprawną liniowością i precyzją, a odzyski tyreostatyków są zgodne z obowiązującymi wymaganiami dla poszczególnych zakresów stężeń. Wyznaczone z krzywych kalibracyjnych wartości limitów detekcji są 50-krotnie niższe od prezentowanych w literaturze i nie przekraczają wartości  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Niepewność oszacowana dla stężenia  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  mieści się w zakresie 28 - 36%. Opracowana metoda stosowna jest z powodzeniem w badaniach paszy prowadzonych w PIWet-PIB w Puławach, który jest jedynym w kraju ośrodkiem wykonującym tego rodzaju oznaczenia.

#### **(H6) Opracowanie i zastosowanie metody LC-MS/MS do wykrywania naturalnego tiouracylu w próbkach mleka**

Dyrektywa 96/23/EW nie nakłada obowiązku badań tyreostatyków w próbkach mleka. Jednak fakt stwierdzania obecności tiouracylu w moczu bydła był powodem podjęcia badań, których celem było sprawdzenie, czy ten kancerogeny związek nie występuje naturalnie w innych matrycach biologicznych, np. w mleku, które jest podstawowym surowcem do produkcji żywności przeznaczonej dla niemowląt i dzieci.

Dlatego powzięto decyzję o opracowaniu czulej i prostej metody oznaczania pięciu tyreostatyków w próbkach mleka surowego i mleka w proszku. Dodatkowym argumentem by

podjąć takie zadanie był wzrost zainteresowania badaniami mleka i produktów mlecznych w tym kierunku, szczególnie przez importerów, a kolejnym, bardzo nieliczne doniesienia literaturowe dla tej matrycy [32, 33].

Opracowaną procedurę oraz wyniki badań próbek mleka z jej zastosowaniem przedstawiono w publikacji **H6**. Korzystając z wcześniejszych doświadczeń w analityce tyreostatyków, przyjęto warunki detekcji i rozdziału chromatograficznego zaprezentowane w publikacji **H4** i **H5**, po wprowadzeniu niezbędnych modyfikacji poprawiających między innymi rozdział chromatograficzny analitów.

Tyreostatyki z mleka ekstrahowano metanolem, mieszaninę poddawano działaniu temperatury, a następnie odwirowano uzyskując bardzo czysty ekstrakt i całkowite usunięcie białek, których obecność mogła powodować wystąpienia efektu matrycy. Kolejnym etapem było pozbowienie próbek tłuszczu, co uzyskano stosując dwukrotną ekstrakcję z eterem naftowym. Następnie tyreostatyki przeprowadzono w pochodne poddając je reakcji z bromkiem jodobenzylu. W pracy szczególny nacisk położono na poprawę powtarzalności dla tapazolu. Przeprowadzone badania wykazały, że pH mieszaniny derywatywacyjnej przed ekstrakcją pochodnych eterem dietylowym ma ogromny wpływ na wydajność ekstrakcji tapazolu; niewielkie zmiany pH powodowały znaczne różnice w intensywności sygnału chromatograficznego, co skutkowało brakiem powtarzalności oznaczanych stężeń. Optymalną dla wszystkich badanych związków wartość pH ustalono na 4,5, uzyskując dla tapazolu znaczną poprawę odzysku i przede wszystkim powtarzalności, co było głównym mankamentem prezentowanych dotychczas w literaturze metod opartych na oznaczaniu tyreostatyków w formie pochodnych.

W pracy dużo uwagi poświęcono też badaniom efektu matrycy i sposobom jego eliminacji. Dla próbek mleka surowego nie zaobserwowano występowania tego niekorzystnego zjawiska, natomiast dla próbek mleka w proszku stwierdzono znaczne wzmocnienie sygnału dla tapazolu i fenyliotouracylu oraz nieznaczne obniżenie dla propylotouracylu. Próby redukcji efektu matrycy poprzez modyfikację składu fazy ruchomej oraz opisywane w literaturze kolejne rozcieńczenia końcowego ekstraktu próbki [34] nie przyniosły sukcesu. Również zastosowanie, wobec braku dostępności znaczonych izotopowo standardów wewnętrznych tyreostatyków, jednego standardu wewnętrznego – dimetyliotouracylu, dla wszystkich badanych analitów, nie było skuteczne, dlatego zdecydowano, że analiza ilościowa tyreostatyków w próbkach mleka w proszku powinna być prowadzona w oparciu o krzywą kalibracyjną matrycową.

Dla obydwu matryc przeprowadzono odrębne badania walidacyjne obejmujące analizę około 200 próbek. Dla wszystkich badanych związków uzyskano poprawne wartości odzysku mieszczące się w przedziale od 90 do 110%. Opracowana metoda cechuje się dobrą liniowością ( $r > 0,99$ ) i powtarzalnością, współczynnik C.V. nie przekracza 30%.

Wyznaczone limity decyzyjne metody mieszczą się w zakresie od  $0,63 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$  do  $2,25 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$ , a zdolność oznaczania od  $0,99 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$  do  $3,84 \mu\text{g L}^{-1}(\text{kg}^{-1})$ . Dla wszystkich analitów spełnione zostały też kryteria wymagane dla metod potwierdzających tzn. zgodność czasów retencji i względnych intensywności jonów.

Stosując przygotowaną metodę wykonano badania próbek mleka pobranych w gospodarstwie, w którym wcześniej w próbkach moczu była stwierdzono tiouracyl w stężeniach przekraczających  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ , próbek dostarczonych do laboratorium z powodu wymagań importowych oraz w mleku dostępnym komercyjnie. Zbadano 19 próbek mleka surowego i w 5 potwierdzono obecność tiouracylu powyżej limitu decyzyjnego metody, a najwyższe oznaczone stężenie wyniosło  $4,2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Trzy próbki mleka zawierające tiouracyl pochodziły z wyżej wymienionego gospodarstwa, w którym jak wykazało postępowanie wyjaśniające nie podawano zwierzętom preparatów z tyreostatykami, ale stosowano paszę zawierającą około 40% śrutę rzepakowej, podczas gdy maksymalna dopuszczalna zawartość to 30%. Dlatego uznano, że wykryty tiouracyl ma naturę endogenną, a jego obecność w próbkach mleka wynika prawdopodobnie ze stosowania u zwierząt diety bogatej w śrutę rzepakową. Z piśmiennictwa wynika, że tiouracyl może występować endogennie u niektórych gatunków zwierząt, między innymi w następstwie stosowania w ich diecie roślin krzyżowych, do których należy rzepak [35].

Zbadano też 15 próbek mleka w proszku i w 8 wykryto tiouracyl o stężeniach od  $1,1 \mu\text{g kg}^{-1}$  do  $3,2 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Obecnie nie ma określonych maksymalnych dopuszczalnych stężeń tyreostatyków w mleku, ponieważ są to związki niedozwolone w produkcji zwierzęcej. W przeszłości stosowano je w tuczu zwierząt rzeźnych, ale podawanie tych związków krowom mlecznym jest całkowicie nieuzasadnione. Występowanie tiouracylu w próbkach mleka, nawet w bardzo niskich stężeniach, jest zjawiskiem bardzo niekorzystnym, ponieważ jest to związek toksyczny, a ponadto oddziałuje na funkcjonowanie gruczołu tarczowego. Biorąc pod uwagę ochronę zdrowia człowieka, a w szczególności dobro dzieci, badaniami kontrolnymi w kierunku tyreostatyków powinno być objęte także mleko.

Należy podkreślić, że jest to pierwsze prezentowane w literaturze doniesienie o występowaniu naturalnego tiouracylu w mleku. PIWEt-PIB jest jedynym ośrodkiem w kraju wykonującym badania tyreostatyków w mleku.

**(H7) Ocena sytuacji epidemiologicznej w zakresie występowania naturalnego tiouracylu w moczu zwierząt rzeźnych w Polsce i określenie wartości progowej stężenia dla tego związku**

Wprowadzenie do rutynowych badań kontrolnych tyreostatyków bardzo czułej metody (50-krotne obniżenie limitów detekcji) spowodowało, że w 2008 roku, po raz pierwszy w Polsce, w próbce moczu pobranej od bydła stwierdzono obecność tiouracylu. W kolejnych latach w 16 próbkach moczu pobranych zarówno od bydła, jak i od trzody potwierdzono obecność tego związku powyżej stężenia rekomendowanego -  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . Również w innych krajach europejskich od kilku lat wykrywa się tiouracyl w moczu zwierząt rzeźnych i według raportu EFSA z 2013 roku [16] jest to najczęściej stwierdzany związek z grupy A. Występowanie tiouracylu w próbkach moczu może być wynikiem nielegalnego podawania tyreostatyków zwierzętom w celach anabolicznych lub też skarmiania zwierząt paszą zawierającą rośliny krzyżowe, do których należy stosowany powszechnie w Polsce rzepak. Jak wynika z piśmiennictwa, tiouracyl może występować endogennie u niektórych gatunków zwierząt, między innymi w następstwie stosowania w ich diecie roślin kapustowatych (*Brassicaceae*) [35]. Przeprowadzane przez Inspekcję Weterynaryjną postępowania wyjaśniające nie dały podstawy do stwierdzenia, że tiouracyl był podawany zwierzętom, stąd wniosek, że jego natura była endogenna. Mechanizm powstawania tiouracylu w organizmach zwierząt nie jest wciąż w pełni wyjaśniony, badania nad jego dokładnym ustaleniem oraz poszukiwanie markerów tego związku prowadzone są w wielu europejskich ośrodkach naukowych i również w PIWet-PIB w Puławach. W chwili obecnej nie ma możliwości odróżnienia endogennej od egzogennej natury tego związku.

Dlatego ważnym zadaniem było przeprowadzenie badań epidemiologicznych w celu określenia naturalnego poziomu tiouracylu u zwierząt rzeźnych w Polsce oraz wyznaczenie wartości progowej stężenia (tzw. „threshold values”), powyżej której z określonym prawdopodobieństwem można stwierdzić, że obecność tiouracylu w próbce jest pochodzenia endogennego, a nie rezultatem nielegalnego stosowania anaboliku.

W pracy **H7** przedstawiono wyniki badań dotyczące występowania naturalnego tiouracylu w próbkach moczu bydła i trzody pobranych w Polsce od czerwca 2010 roku do lipca 2011 roku, w ramach krajowego programu kontroli pozostałości. Na zbadanych 537 próbek moczu, obecność tiouracylu powyżej limitu decyzyjnego metody CC $\alpha$  ( $0,91 \mu\text{g L}^{-1}$ ) stwierdzono w 77, co stanowiło 14,3% analizowanych próbek; w ośmiu próbkach (1,5%) stężenie tiouracylu przekroczyło wartość  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (RC). Tiouracyl był obecny zarówno w moczu pobranym od świń (40 próbek) jak i od bydła (36 próbek). Średnie stężenie tego związku w moczu bydła wyniosło  $0,74 \mu\text{g L}^{-1}$ , w moczu świń było prawie dwukrotnie niższe



(0,43  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), co może się wiązać z niższą zawartością roślin krzyżowych w diecie tego gatunku zwierząt.

Naturalny rozkład uzyskanych stężeń tiouracylu umożliwił określenie 95 i 99 percentyla. Badania wykazały, że 95% i 99% próbek pobranych od bydła posiada stężenia niższe niż 4,50 i 14,85  $\mu\text{g L}^{-1}$ , natomiast dla moczu trzody nie przekracza wartości 2,35 i 6,80  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Wyznaczone w ten sposób wartości progowe dla bydła są bardzo zbliżone do proponowanych przez francuskich naukowców (6,2 i 12,1  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), którzy przeprowadzili badania na większej populacji zwierząt i świadczą, że pochodzenie zwierząt i rodzaj paszy nie ma większego wpływu na poziom tego związku w próbkach moczu. Wyznaczone wartości progowe w prowadzonych przeze mnie badaniach jak i doniesienia Francuzów wyraźnie wskazały na konieczność zmiany proponowanego dotychczas stężenia rekomendowanego wynoszącego 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Przedstawiona praca jest drugą w świecie, a pierwszą w Polsce opisującą występowanie naturalnego tiouracylu w moczu zwierząt rzeźnych. Opublikowane wyniki badań zostały docenione przez naukowców z innych krajów, dlatego zaproponowano nam udział w prowadzonych w Belgii badaniach nad wyznaczeniem nowej wartości progowej, w oparciu o wyniki z sześciu krajów europejskich. Udział Polski w tym projekcie był znaczący, szczególnie w odniesieniu do próbek pobranych od trzody. Wyniki tych badań zostały przedstawione w publikacji, której jestem współautorem [36], a wyznaczone na dużej populacji zwierząt wartości graniczne zbliżone do zaprezentowanych w mojej pracy. W oparciu o nowe dane dotyczące naturalnych poziomów stężeń tiouracylu w moczu zwierząt rzeźnych, Europejskie Laboratorium Referencyjne w RIKILT Wageningen zaproponowało dla tiouracylu nową wartość stężenia rekomendowanego wynoszącą 30  $\mu\text{g L}^{-1}$  [4].

### Osiągnięcia

- Opracowano sześć nowoczesnych metod analitycznych, z wykorzystaniem chromatografii cieczowej z tandemową spektrometrią mas, pozwalających oznaczyć i potwierdzić w próbkach biologicznych pochodzenia zwierzęcego i paszy, dwadzieścia pięć związków wykazujących działanie anaboliczne.

Metody spełniają międzynarodowe standardy analityczne wymagane dla substancji niedozwolonych i obejmują cztery grupy związków anabolicznych, których kontrola jest obligatoryjna zgodnie z obowiązującymi w UE aktami prawnymi.

Opracowane metody wypełniły istniejącą w kraju lukę w analityce pozostałości anabolików w tkankach zwierzęcych, znacznie poszerzyły możliwości analityczne

laboratorium i przyczyniły się do zwiększenia zakresu prowadzonych badań naukowych dotyczących występowania hormonów pseudo endogennych.

Wszystkie metody zostały wdrożone do Krajowego programu badań kontrolnych obecności substancji niedozwolonych oraz pozostałości chemicznych, biologicznych i produktów leczniczych u zwierząt i w żywności pochodzenia zwierzęcego oraz badań diagnostycznych, gwarantując wysoki poziom prowadzonych badań.

Przy ich użyciu po raz pierwszy w Polsce potwierdzono w moczu zwierząt rzeźnych obecność hormonów steroidowych - 19-nortestosteronu, 17 $\alpha$ - i 17 $\beta$ -boldenonu oraz tiouracylu z grupy tyreostatyków.

W próbkach mleka surowego i mleka w proszku stwierdzono (po raz pierwszy w świecie) obecność endogennego tiouracylu. Mleko, którego kontrola w kierunku tyreostatyków nie jest obligatoryjna może być więc źródłem kancerogennego związku wprowadzanego do łańcucha pokarmowego (H1-H6).

- Na podstawie przeprowadzonych badań epidemiologicznych określono po raz pierwszy w Polsce poziom naturalnego tiouracylu występującego w moczu zwierząt rzeźnych i wyznaczono wartość progową stężenia tego związku. Przeprowadzone badania przyczyniły się do nowelizacji obowiązujących dotychczas w Europie kryteriów dotyczących wartości progowych tiouracylu w moczu bydła i trzody (H7).

### Piśmiennictwo

1. Jamroz D, Potkański A.: Żywnienie zwierząt i paszoznawstwo. Podstawy szczegółowego żywienia zwierząt. *Wydawnictwo Naukowe PWN SA*, Warszawa 2001.
2. Kossila V.L.: The use of anabolic steroids in animal production –The FAO position. Meissonnier E.: Anabolics in animal production. Soregraph, Levallois, 1983, 497-503.
3. Meyer H.D., Karg H.: Growth stimulators for farm animals: mode of action, effects on meat quality and potential risk originating from residues. Proc. FAO/CAAS Workshop on Biotechnology in Animal Production and Health in Asia and Latin America, Beijing, Oct 9-13, 1989, 49-58.
4. EURL Reflection paper: natural growth promoting substances in biological samples. RIKILT Wageningen UR, Wageningen, 14 May 2014.
5. Korach K.S., McLachan J.A.: The role of the estrogen receptor in diethylstilbestrol toxicity. *Arch.Toxicol.Suppl.*, 1985, 8, 33-42.
6. Leffers H., Naesby M., Vendelbo B., Skakkebaek N.E., Jørgensen M.: Oestrogenic potencies of zeranol, estradiol, diethylstilbestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Human Reproduction*, 2001, 16, 1037-1045.

7. Vanden Bussche J., Verheyden K., Noppe H., Wille K., Pinel G., Le Bizec B., De Brabander H.F.: Analysis of thyreostats: A history of 35 years. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 637, 2-12.
8. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health: Assesment of potential risk to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. 30 April 1999. [http://europa.eu.int/genino/query\\_en.htm](http://europa.eu.int/genino/query_en.htm)
9. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General. Opinion of the Scientific Committee on Veterinary Measures Relating to Public Health on Review of previous SCVPH opinions of 30 April 1999 and 3 May 2000 on the potential risks to human health from hormone residues in bovine meat and meat products. 10 April 2002.
10. Aksglaede L, Juul A., Leffers H., Skakkebaek N.E., Andersson A.M.: The sensitivity of the child to sex steroids: possible impact of exogenous estrogens. *Human Reproduction Update*, 2006, 12, 341-349.
11. Courant F., Antignac J.P., Maume D., Monteau F., Andersson A.M., Skakkebaek N. André F., Le Bizec B.: Exposure assessment of prepubertal children to steroid endocrine disrupters. Analytical strategy for estrogens measurements in plasma at ultra-trace level. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 586, 105 -114.
12. Council Directive 88/146/EEC, Off J Eur Commun 1988, L 128:36.
13. Council Directive 96/22/EC, Off J Eur Commun 1996, L 125:3.
14. Council Directive 2003/74/EC, Off J Eur Commun 2003, L 262:17.
15. Council Directive 96/23/EC L, Off J Eur Commun 1996, 125:10.
16. European Food Safety Authority; Report for 2013 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products. EFSA supporting publication 2015:EN-723.
17. Commission Decision 2003/181/EC, Off J Eur Commun 2003, L 71:17.
18. CRL Guidance Paper, CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans. 2007, December 2007.
19. Scarth J.P., Kay J., Teale P., Akre C., Le Bizec B., De Brabander H.F., Vanhaecke L., Van Ginkel L., Points J.: A review of analytical strategies for the detection of 'endogenous' steroid abuse in food production. *Drug Test. Analysis*, 2012, 4 (S1), 40-49.
20. Commission Decision 2002/657/EC, Off J Eur Commun 2002, L 221:8.
21. De Brabander H. F., Le Bizec B., Pinel G., Antignac J.-P., Verheyden K., Mortier V., Courtheyn D., Noppe H.: Past, present and future of mass spectrometry in the analysis of residues of banned substances in meat-producing animals. *J. Mass Spectrom.* 2007, 42, 983-998.
22. European Commission SANCO/2004/2726 Guidelines for the implementation of decision 2002/657/EC rev 4- December 2008.
23. PN-EN ISO/IEC 17025:2005 Ogólne wymagania dotyczące kompetencji laboratoriów badawczych i wzorcujących
24. Woźniak B.: Hormone residues control in slaughtered animals in Poland in 2000-2001. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 46, 331-335, 2002.
25. Xu Hong, Gu Long, He jia, Lin Anqing, Tang Danzhou: Simultaneous determination of residual stilbenes and stilbene metabolites in animal tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr. B*, 2007, 852, 529-533.

26. Verheyden K., Le Bizec B., Courtheyn D., Mortier V., Vandewiele M., Gillis W., Vanthemsche P., De Brabander H.F., Noppe H.: Mass spectrometric detection of and similarities between 1-androgens. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 586, 57-72.
27. Antignac J.P., De Wasch K., Monteau F., De Brabander H., Andre F., Le Bizec B.: The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Anal. Chim. Acta*, 2005, 529, 129-136.
28. Stolker A.A.M., Zuidema T., Nielen M.W.F.: Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Anal. Chem.*, 2007, 26, 967-979.
29. De Wasch K., De Brabander H.F., Van Ginkel L.A., Spaan A., Sterk S.S., Meiring H.D.: Confirmation of residues of thyreostatic drugs in thyroid glands by multiple mass spectrometry after thin-layer chromatographic screening. *J Chromatogr. A*, 1998, 819, 99-111.
30. Pinel G., Bichon E., Pouponneau K., Maume D., Andre F., Le Bizec B.: Multi-residue method for the determination of thyreostats in urine samples using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry after derivatisation with 3-iodobenzylbromide. *J Chromatogr. A*, 2005, 1085, 247-252.
31. Kong D.X., Chi Y.W., Chen L.C., Dong Y.Q., Zhang L., Chen G.N.: Determination of thyreostatics in animal feeds by CE with electrochemical detector. *Electrophoresis*, 2009, 30, 3489-3495.
32. Zou Q-H., Liu Y., Xie M-X., Han J., Zhang L.: A rapid method for determination and confirmation of the thyreostats in milk and urine by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, 2005, 551, 184-191.
33. Církva A., Štastný K.: Method for the determination of thyreostats in milk samples using LC-MS/MS. *Food Addit Contam Part A*, 2013, 30,,983-986.
34. Stahnke H., Kittlaus S., Kempe G., Alder L.: Reduction of matrix effects in liquid chromatography – electrospray ionization –mass spectrometry by dilution of the sample extracts: How much dilution is needed? *Anal. Chem.*, 2012, 84, 1474-1482.
35. Pinel G., Mathieu S., Cesbron N., Maume D., De Brabander H.F., Andre F., Le Bizec B.: Evidence that urinary excretion of thiouracil in adult bovine submitted to a cruciferous diet can give erroneous indications of the possible illegal use of thyreostats in meat production. *Food Addit. Contam.*, 2006, 23, 974-980.
36. Wauters J., Vanden Bussche J., Le Bizec B., Kiebooms J.A.L., Dervilly-Pinel G., Prevost S., Wozniak B., Sterk S.S., Grønningen D., Kennedy D.G., Russell S., Delahaut P., Vanhaecke L.: Towards a New European Threshold to Discriminate Illegally Administered from Naturally Occurring Thiouracil in Livestock, *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63(5), 1339-1346.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych.

### 5 a) Pozostałe osiągnięcia naukowo badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk weterynaryjnych

Pracę w Państwowym Instytucie Weterynaryjnym podjęłam w 1986, w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego (ZHŻPZ). Od początku, zajmowałam się problemem pozostałości hormonów anabolicznych w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Ponieważ w 1988 roku w krajach Europejskiej Wspólnoty Gospodarczej wprowadzono zakaz stosowania anaboliów w tuczu zwierząt rzeźnych, państwa eksportujące żywność do tych krajów zobowiązane były do prowadzenia badań kontrolnych. Dlatego w pierwszym okresie głównym celem mojej pracy był rozwój metod analitycznych umożliwiających prowadzenie takich badań. Biorąc pod uwagę możliwości aparaturowe zakładu i ciągły postęp w technikach detekcji, na przestrzeni kolejnych lat przygotowane zostały metody oznaczania hormonów w moczu i tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych oparte o chromatografię cienkowarstwową, dwukierunkową wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową, metodę immunoenzymatyczną ELISA, chromatografię cieczą z detektorem diodowym oraz chromatografię gazową z detektorem wychwytu elektronów. Należy dodać, że w już w 1994 roku zastosowałam do oczyszczania próbek biologicznych ekstrakcję do fazy stałej na kolumnkach C18, która to technika do chwili obecnej jest najczęściej stosowana na etapie przygotowania próbek do analizy instrumentalnej. Większość opracowanych metod została wydana w formie instrukcji metodycznych, przekazana laboratoriom ZHW i wdrożona do badań. Oprócz realizacji prac metodycznych prowadziłam badania dotyczące wpływu zabiegów termicznych na poziom hormonów w produktach pochodzenia zwierzęcego.

Drugi ważny kierunek mojej aktywności to badania pozostałości tyreostatyków u zwierząt rzeźnych w Polsce. Angażowana też byłam do rozwiązywania bieżących problemów analitycznych, przygotowałam między innymi metodę oznaczania gatunkowości żelatyny, której badania zalecono w kraju po doniesieniach o występowaniu BSE u bydła.

Po wprowadzeniu Decyzją Rady 2002/657/EW szczególnych wymagań dotyczących metod stosowanych w badaniach związków zakazanych, tzn. konieczności potwierdzeń technikami chromatograficznymi sprzężonymi ze spektrometrią mas, w 2003 roku przystąpiłam do wdrażania do badań hormonów w Polsce metod opartych o technikę chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas, co było między innymi przedmiotem mojej pracy doktorskiej. W trakcie opracowywania procedur szczególny nacisk położono na dobór metody przeprowadzania hormonów w lotne pochodne, ponieważ tylko w takiej postaci mogą być analizowane metodą GC-MS. Dużym sukcesem było zastosowanie skutecznej, dwuetapowej metody derywatywacji trenbolonu z MSTFA i jodem, jako katalizatorem, ponieważ jest on jest związkiem niezwykle trudnym do analizy metodą chromatografii gazowej.

Efektom pracy było opracowanie czterech wieloskładnikowych, procedur analitycznych obejmujących wszystkie anality, których badania były wymagane zgodnie z Dyrektywą 96/23/WE. Do chwili obecnej procedury te stosowane są do celów skryningowych w PIWet- PIB i laboratoriach regionalnych ZHW.

Wyniki prowadzonych w tym okresie badań przedstawiono w między innymi w następujących publikacjach:

**Woźniak B.:** Kontrola pozostałości tyreostatyków w tkankach zwierząt rzeźnych. *Gosp. Mięsna*, 1994, 11, 28.

**Woźniak B., Wojtoń B.:** Immunoenzymatic method for progesterone detection in bovine urine, muscles and serum by means of a commercial EIA test used in human medicine. *Bull Vet Inst Pulawy*, 1995, 39, 139-144.

**Woźniak B., Wojtoń B.:** Detection of the anabolic hormone residues in the urine and muscles of food-producing animals by HPTLC with application of extraction into a solid phase. *Bull Vet Inst Pulawy*, 1996, 40, 55-59.

**Woźniak B.:** Effect of freezing on anabolic hormone residues in bovine and poultry meat samples. *Bull Vet Inst Pulawy*, 1998, 42, 173-176.

**Woźniak B.:** Effect of heating on anabolic hormone residues in meat. *Bull Vet Inst Pulawy*, 1999, 43, 227-230.

**Woźniak B.:** Określanie gatunkowości żelatyny metoda ELISA. *Rocz. Nauk. Zoot., Supl.* 2000, 425-429.

**Woźniak B., Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.,** Determination of 17 $\beta$ -oestradiol and testosterone in bovine serum with gas chromatography-mass spectrometry, *Bull Vet Inst Pulawy*, 2011, 55, 755-759.

**Woźniak B., Matraszek-Żuchowska I., Semeniuk S., Kłopot A, Żmudzki J.:** „Screening and confirmatory GC-MS methods for the detection of trenbolone in bovine urine”. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2013, 57, 559-566.

oraz monografiach:

**Woźniak B.:** Oznaczanie hormonów naturalnych w surowicy bydłej metodą ELISA. Monografia PIWet-PIB, 2003.

**Woźniak B., Matraszek I.:** Opracowanie metod oznaczania hormonów w paszy. Monografia PIWet. Puławy 2005, 123-134.

**Woźniak B., Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J.,** Oznaczanie hormonów anabolicznych w paszy metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. *Pasze Przemysłowe*, Wyd. Instytutu Zootechniki – PIB w Krakowie, Krajowe Laboratorium Pasz w Lublinie, 2010, 74-77.

**Woźniak B., Matraszek-Żuchowska I, Kłopot A., Żmudzki J.:** Oznaczanie hormonów steroidowych w tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Monografia „Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków”. Wydawnictwo UWM, Olsztyn 2010, 29-34.

## 5 b) Osiągnięcia naukowo badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk weterynaryjnych

W 2007 roku zespół badania pozostałości związków anabolicznych został przeniesiony z Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego do Zakładu Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB, dlatego stopień doktora nauk weterynaryjnych uzyskałam będąc pracownikiem tego zakładu. Mimo zmiany miejsca pracy nie zmienił się profil moich zainteresowań naukowych, uległ natomiast poszerzeniu.

### Biotesty w ocenie aktywności hormonalnej próbek biologicznych

W związku z wprowadzeniem w krajach UE zakazu stosowania hormonalnych związków do stymulacji wzrostu zwierząt rzeźnych, zaistniała potrzeba stworzenia skutecznych systemów wykrywania tych związków. Dlatego opracowano wiele metod analitycznych przeznaczonych do oznaczania hormonów w różnych matrycach. Wadą większości prezentowanych metod skryningowych jest ograniczony zakres badanych związków, niezależnie czy są to metody immunologiczne czy chromatograficzne.

Ponieważ liczba stymulatorów wzrostu, które mogą być wykorzystywane w tuczu zwierząt ciągle rośnie i obejmuje zarówno naturalne, jak i syntetyczne pochodne hormonów steroidowych, opracowanie metod wielokierunkowych, umożliwiających analizę wielu analitów, z różnych klas związków równocześnie jest obecnie ważnym wyzwaniem dla analityków. Alternatywą dla metod instrumentalnych są szybkie skryningowe testy biologiczne, oparte na oznaczaniu nie poszczególnych związków, a całkowitej aktywności hormonalnej próbki. Do takich testów należy opracowany w RIKILT w Holandii test aktywacji transkrypcyjnej receptora estrogenowego (REA) i androgenowego (RAA), opartego na drożdżach (*Saccharomyces cerevisiae*) transformowanych genem białka zielonej fluorescencji (Green Fluorescent Protein, GFP). W obecności agonistów receptorów estrogenowych (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ) lub androgenowego (AR) w transformowanych komórkach drożdży dochodzi do ekspresji genu reporterowego kodującego GFP. Na podstawie pomiaru fluorescencji próbki można stwierdzić, czy są w niej obecne związki wykazujące właściwości estrogenne lub androgenne.

Oprócz testów *in vitro*, znane są również testy *in vivo*, które umożliwiają wykrywanie substancji o działaniu estrogennym (test uterotropowy) oraz androgennym i/lub antyandrogenym (test Hershbergera).

W ramach projektu badawczego Narodowego Centrum Nauki (N308 267238) uczestniczyłam w badaniach, których celem była ocena przydatności wymienionych biotestów do badań próbek biologicznych pochodzenia zwierzęcego oraz pasz. Badania

*in vivo* prowadzone były na samicach i samcach chomika złocistego, (*Mesocricetus aureatus*).

Badania wykazały, że obydwie testy, zarówno REA jak i RAA są specyficzne, lecz ich przydatność do badań kontrolnych pozostałości związków hormonalnych w moczu zwierząt rzeźnych jest ograniczona. Mimo, że test REA jest bardzo czuły i umożliwia wykrywanie aktywności estrogennej w moczu odpowiadającą  $0,07 \mu\text{g EEQ L}^{-1}$  (w przeliczeniu na  $17\beta$ -estradiol), to może być stosowanych jedynie w badaniach próbek pobranych od bardzo młodych zwierząt, ponieważ u starszych poziom endogennej estrogenów przekracza czułość testu, co oznacza, że uzyskane wyniki byłyby niezgodne i próbki należałoby poddać analizie metodami potwierdzającymi. Natomiast test RAA nie jest wystarczająco czuły do badań związków androgennych w moczu.

Wstępne badania optymalizacyjne testów *in vivo* wykazały brak wrażliwości chomików na modelowy estrogen  $17\alpha$  etynyloestradiol (EE2). Przyczyną była duża zawartość fitoestrogenów w paszy przeznaczanej dla gryzoni, co potwierdzono metodami instrumentalnymi. Dlatego test REA zastosowano do oznaczania aktywności hormonalnej próbek paszy. Badania walidacyjne wykazały, że test REA umożliwia wykrywanie aktywności estrogennej paszy odpowiadającej stężeniu  $17\beta$ - estradiolu równemu  $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Spośród przebadanych 24 próbek paszy przeznaczanej dla zwierząt laboratoryjnych, towarzyszących oraz rzeźnych, wysoką aktywność estrogeną stwierdzono w próbkach paszy przeznaczanej dla gryzoni i w jednej próbce paszy przeznaczanej dla psów, w pozostałych nie potwierdzono aktywności hormonalnej. Otrzymane wyniki wskazują na konieczność badania paszy przeznaczanej dla zwierząt laboratoryjnych w celu wykluczenia nieprawidłowych wyników doświadczeń.

Wyniki prowadzonych badań przedstawiono w publikacjach:

**Woźniak B.**, Minta M., Stypuła-Trebas S., Radko L., Zmudzki J.: „Evaluation of estrogenic activity in animal diets using in vitro assay”. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28, 70-75.

Minta M., Radko L., Stypuła-Trebas S., **Woźniak B.**, Zmudzki J.: „Influence of dietary soy isoflavones on immature hamster uterotrophic and Hershberger assays”. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2013, 57, 579-585.

oraz doniesieniach:

**Woźniak B.**, Stypuła-Trębas S., Minta M., Radko L., Żmudzki J., In-House validation of yeast estrogen bioassay for the determination of estrogenic activity in feed, 136, European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (ESTIV2012), Lizbona, Portugalia, 2012.10.16-19



Minta M., Stypuła-Trębas S., **Woźniak B.**, Radko L., Żmudzki J., Evaluation of estrogenic activity in animal diets using in vitro assay, 146, European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (ESTIV2012), Lizbona, Portugalia, 2012.10.16-19.

Minta M., Stypuła-Trębas S., Radko L., **Woźniak B.**, Żmudzki J.: Biotesty w ocenie aktywności estrogennej żywności i pasz. Człowiek, Żywność, Środowisko. Problemy współczesnej Toksykologii. Konferencja PTTOKS, Olsztyn 2014, str.180.

### Badania naturalnych i syntetycznych estrogenów w próbkach środowiskowych

W ostatnich latach coraz większą uwagę poświęca się problemom zanieczyszczenia środowiska związkami zaburzającymi funkcje endokrynne tzw. "endocrine disruptors" (EDC). Istnieją doniesienia o negatywnych skutkach obecności EDC w środowisku wodnym, takich jak feminizacja ryb, czy efekty toksykologiczne dla dzikich zwierząt. Naturalne i syntetyczne hormony steroidowe z grupy estrogenów uznawane są za jedne z ważniejszych czynników endokrynnych, których obecność na nawet bardzo niskich poziomach rzędu  $\text{ng L}^{-1}$ , może mieć negatywny wpływ na organizmy wodne. Coraz szersze stosowanie preparatów hormonalnych zarówno w medycynie ludzkiej (antykoncepcja, hormonalna terapia zastępcza) jak i weterynaryjnej powoduje, że związki te są ciągle odprowadzane do środowiska bezpośrednio jak i z powodu niekompletnego usunięcia ich przez oczyszczalnie ścieków. Dlatego wciąż podejmowane są starania by dokładniej oszacować stężenia estrogenów w środowisku, zidentyfikować ich źródła i sposoby transferu do ekosystemów wodnych. Przygotowanie odpowiednio czułych metodyk do oznaczania tych związków w próbkach środowiskowych stało się jednym z ważniejszych zadań z zakresu chemii analitycznej oraz ochrony środowiska.

Dlatego podjęto się opracowania prostej i czułej metody oznaczania w wodach powierzchniowych pięciu estrogenów:  $17\alpha$ -estradiolu,  $17\beta$ -estradiolu, estronu, estriolu,  $17\alpha$ -etynyloestradiolu. Próbkę wody po odwirowaniu i przefiltrowaniu poddawano hydrolizie enzymatycznej w celu przeprowadzenia metabolitów estrogenów w wolne związki. Hormony izolowano z wody stosując ekstrakcję do fazy stałej na kolumnkach  $\text{C}_{18}$ . Badania prowadzone były metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Przed analizą GC-MS estrogeny przeprowadzono w lotne pochodne poddając je reakcji derywatywacji z MSTFA. Wyniki walidacji metody potwierdziły jej przydatność do oznaczania estrogenów w próbkach środowiskowych, w których występują w bardzo niskich stężeniach, na poziomie  $\text{ng L}^{-1}$ . Limity detekcji dla pięciu badanych związków mieściły się w przedziale 0,3- 0,6  $\text{ng L}^{-1}$ , a odzysk estrogenów ze wzbogaconych próbek wynosił od 90% do 120% przy współczynniku zmienności poniżej 30%.

Opracowaną metodę zastosowano do badania wód powierzchniowych w Polsce. Próbki wody zostały pobrane latem i jesienią 2011 roku z pięciu rzek: Wisły, Odry, Dunajca, Brdy i Wkry oraz z 2 jezior mazurskich, jednego pomorskiego i Zbiornika Rybnickiego. Spośród 19 badanych próbek wody w 15 stwierdzono obecność jednego lub kilku estrogenów. Najwięcej próbek zawierało estradiol, w kilku próbkach wykryto estron i estriol oraz 17 $\alpha$ -etynyloestradiol.

Przeprowadzone badania wykazały w wodach powierzchniowych Polski obecność naturalnych i syntetycznych estrogenów, które niekorzystnie mogą wpływać na stan środowiska wodnego. Ponieważ prac naukowych prezentujących wyniki analiz środowiskowych pod kątem obecności estrogenów dla obszaru Polski jest bardzo mało, uzyskana wyniki mają dużą wartość poznawczą.

Efektom prowadzonych badań jest publikacja:

**Woźniak B.**, Kłopot A., Matraszek-Żuchowska I., Sielska K., Żmudzki J.: Determination of natural and synthetic oestrogens in surface water using gas chromatography-mass spectrometry. *Bull Vet Inst Pulawy*, 2014, 58, 603-611.

oraz doniesienia:

**Woźniak B.**, Kłopot A., Żmudzki J.: Występowanie estrogenów w wodach wybranych polskich rzek i jezior. Człowiek, Żywność, Środowisko. Problemy współczesnej Toksykologii. Konferencja PTTOKS, Olsztyn 2014, 58.

**Woźniak B.**, Sielska K., Żmudzki J.: Oznaczanie estrogenów w osadach rzecznych metodą chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Człowiek, Żywność, Środowisko. Problemy współczesnej Toksykologii. Konferencja PTTOKS, Olsztyn 2014, 237.

## Podsumowanie dorobku publikacyjnego

Rodzaj publikacji	Przed uzyskaniem stopnia dr	Po uzyskaniu stopnia dr	Razem
Artykuły z listy JRC ( w tym wchodzące w skład osiągnięcia)	4	15 (7)	19
Artykuły spoza listy JRC	15	1	16
Artykuły monograficzne	7	8	15
Doniesienia na konferencjach			
- międzynarodowych	22	17	39
- krajowych	47	17	64
<b>ŁĄCZNIE</b>	<b>95</b>	<b>58</b>	<b>153</b>
<b>Pierwszy autor</b>	<b>74 (78%)</b>	<b>43 (74%)</b>	<b>117 (76%)</b>

Sumaryczny IF <sup>1)</sup> wszystkich prac	25,535
Liczba cytowań wszystkich prac <sup>2)</sup>	40
Suma punktów MNiSW wszystkich prac <sup>3)</sup>	488
- po uzyskaniu stopnia doktora	430
Index Hirscha <sup>4)</sup>	4

Sumaryczny IF prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	15,876
Liczba cytowań prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	33
Suma punktów MNiSW prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego	200

1), 3) Zgodnie z rokiem opublikowania

2), 4) Według bazy Web of Science z 24.02.2016

## 5c) Udział w projektach badawczych

### **Projekty badawcze krajowe:**

Projekt Komisji Badan Naukowych Nr 5/00: Wykrywanie pozostałości hormonów anaboliców w tkankach zwierzęcych, 1992-1995, **wykonawca**

Projekt celowy zamawiany nr PCZ 014-26 (503/152/3/16): Doskonalenie metod wykrywania oraz ocena zagrożeń w zakresie chorób odzwierzęcych i skażeń żywności. Opracowanie metod oznaczania hormonów w paszy, 2002-2005, **kierownik**

Projekt badawczy NCN nr N N308 267238: Biotesty w ocenie aktywności hormonalnej żywności, 2010-2013, **wykonawca**

Projekt badawczy NCN nr N N308 237138: Badania nad wykrywaniem toksyny botulinowej w materiale biologicznym, 2010-2013, **wykonawca**

### **Projekty badawcze realizowane w ramach działalności statutowej Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego w Puławach:**

S/181: Wpływ diety bogatej w rośliny krzyżowe na występowanie endogennego tiouracylu w moczu i mleku bydła, 2014-2016, **kierownik**

S/429: Zastosowanie tandemowej spektrometrii mas do badań pozostałości hormonów w próbkach biologicznych pochodzenia zwierzęcego, 2011-2013, **kierownik**

S/426: Metody skryningowe i potwierdzające oparte o technikę spektrometrii mas w badaniach pozostałości związków anabolicznych w próbkach biologicznych, 2008-2010, **kierownik**

S/607: Opracowanie i walidacja metody oznaczania stanozololu w moczu zwierząt rzeźnych, 2007, **kierownik**

Nr 605/1/16: Opracowanie i walidacja metody GC-MS oznaczania boldenonu w moczu bydlęcym, 2006, **kierownik**

Nr 516/3/16: Opracowanie metody oznaczania hexestrolu i dienestrolu w moczu i tkankach zwierząt rzeźnych, 2004-2005, **kierownik**

Nr 607/1/16: Zastosowanie chromatografii cieczowej do oznaczania pozostałości trenbolonu, octanu trenbolonu i zeranolu w moczu i tkance mięśniowej zwierząt rzeźnych, 2001-2003, **kierownik**

Nr 602/1/16: Wpływ rodzaju próbki i metody oznaczania na wykrywanie pozostałości anaboliców w materiale biologicznym, 1998-2000, **kierownik**

1996-1997: Wpływ zabiegów termicznych na pozostałości hormonów anaboliców w tkance mięśniowej bydła i drobiu, **kierownik**

1995: Próby zastosowania chromatografii cieczowej do oznaczania pozostałości tyreostatyków w mięsie bydlęcym, **kierownik**

1994: Wybranie i adaptacja metody oznaczania progesteronu w tkankach i płynach ustrojowych u bydła, **kierownik**

1993: Zastosowanie chromatografii cieczowej do wykrywania i oznaczania pozostałości hormonów anaboliców w tkankach zwierzęcych, **kierownik**

1989: Metody oznaczania pozostałości hormonów (stymulatorów wzrostu) w tkankach zwierząt rzeźnych, **wykonawca**

#### 5d) Nagrody za działalność naukową i inne

- Nagroda II stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2011 r. w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych za cykl prac przeglądowych, w tym pracę: **Woźniak B.**, Hormony steroidowe- charakterystyka, zastosowanie, pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego. *Medycyna Wet.*, 2010, 66, 177-181.
- Nagroda II stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2012r. w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych za publikację: **Woźniak B.**, Matraszek-Żuchowska I., Żmudzki J., Jedziniak P., Krycińska B., Sielska K., Witek S., Kłopot A.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry with ion trap and triple quadrupole analyzers for determination of thyreostatic drugs in urine and muscle tissue. *Anal Chim Acta*, 2011, 700, 155-166.
- Nagroda II stopnia przyznana przez Dyrektora PIWet-PIB w 2014r. w konkursie na najlepszą publikację pracowników naukowych w kategorii prac oryginalnych za publikację: **Woźniak B.**, Minta M., Stypula-Trębas S., Radko L., Żmudzki J.: „Evaluation of estrogenic activity in animal diets using in vitro assay”. *Toxicology in Vitro*, 2014, 28, 70-75.
- Nagroda zespołowa Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi za wkład w realizację Krajowego Programu Badań Kontrolnych Pozostałości Chemicznych, Biologicznych i Leków, 2005.
- Odznaka Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi „Zasłużony dla Rolnictwa”, 2009.

#### 5e) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach naukowych

##### **Międzynarodowe:**

- Hygiena Alimentorum (1997, 1998, 1999, 2001, 2005, 2006) Słowacja;
- 4<sup>th</sup> World Congress Foodborne Infections and Intoxications (1998) Berlin;
- EAVPT (2000) Jerozolima, Izrael;
- EuroResidue (2004, 2008, 2012) Holandia;
- International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis (2006, 2010, 2014) Belgia;
- International Symposium on Recent Advances in Food Analysis (2009, 2011, 2015) Praga, Czechy;
- European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (ESTIV2012), Lizbona, Portugalia;
- XVII<sup>th</sup> European Conference on Analytical Chemistry (EuroAnalysis XVII) (2013) Warszawa, Polska;
- 42<sup>nd</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations & Related Techniques” - HPLC 2015, Genewa, Szwajcaria.

**Krajowe:**

- Kongres Polskiego Towarzystwa Nauk weterynaryjnych (1992, 1996- **doniesienie ustne**, 2000, 2004, 2008);
- Krajowy Kongres "Żywność, żywienie a zdrowie" (1994) Warszawa;
- Konferencja „Żywność gwarantowanej jakości” (1995) Kraków;
- Sesja naukowa nt. Stanu badań weterynaryjnych w świetle wyników uzyskanych w zakończonych projektach badawczych finansowanych przez KBN (1995) Puławy; **doniesienie ustne**
- Sesja Przeglądowa Analityki Żywności (1996, 1997, 1998, 2002, 2004) Warszawa;
- Ogólnopolska Sesja Naukowa nt. "Monitoringu pozostałości chemicznych i biologicznych w tkankach zwierzęcych i w mleku" (1996) Białystok;
- Sympozjum, „Jakość zdrowotna żywności i przedmiotów użytku” (1997) Warszawa;
- Sesja naukowa „Wpływ dodatków chemicznych do pasz na stan sanitarny mięsa wieprzowego i drobiowego” (1997) Poznań;
- XXIX Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN; Procesy technologiczne a jakość żywności” (1998) Olsztyn;
- Sesja Naukowa " Analityka substancji szkodliwych w żywności i paszach; dobór metod, zapewnienie jakości" (1998) Puławy;
- Sesja Naukowa " Zagrożenie mikrobiologiczne i chemiczne żywności zwierzęcego pochodzenia" (1998) Warszawa;
- XXX Sesja Naukowa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN: Nauka o żywności na progu XXI wieku (1999) Kraków;
- Krajowa Konferencja Naukowa: Higiena Żywności i Żywienia Podstawą Zdrowia. WIHE, Polskie Towarzystwo Nauk Żywnościowych (1999) Szklarska Poręba;
- Seminarium „ Nowoczesne techniki analityczne w biotechnologii Żywności i Środowiska" (1999) Łódź;
- Konferencja" Krajowy program kontroli pozostałości antybiotyków, hormonów i tyreostatyków w surowcach i produktach zwierzęcego pochodzenia - aktualne problemy" (2000) Puławy;
- Sesja Naukowa „ Doskonalenie metod wykrywania i ocena zagrożeń w zakresie chorób odzwierzęcych i skażeń żywności" (2003) Puławy;
- Konferencja Naukowa „ Doskonalenie metod wykrywania oraz ocena zagrożeń w zakresie chorób odzwierzęcych i skażeń żywności" (2005) Puławy;
- Konferencja „Leki weterynaryjne i zanieczyszczenia środowiskowe w żywności i w paszach - aspekty analityczne i ochrona zdrowia publicznego" (2009) Puławy; **doniesienie ustne**
- XXVII Konferencja Naukowo - Techniczna - Międzynarodowa „Analiza zagrożeń i analiza ryzyka w łańcuchu paszowym" (2010) Zwierzyniec; **doniesienie ustne**
- 70 Konferencja naukowa „Farmakologiczne i toksykologiczne aspekty działania ksenobiotyków" (2010) Olsztyn;
- XXVIII Konferencja Naukowo-Techniczna – Międzynarodowa „ Materiały i dodatki paszowe- aktualne wymagania" (2011) Kazimierz Dolny; **doniesienie ustne**

- Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego „Toksykologia w służbie publicznej” (2011) Jurata; **doniesienie ustne**
- Konferencja PTTOKS „Człowiek, Żywność, Środowisko. Problemy współczesnej Toksykologii” (2014) Olsztyn;
- IX Polska Konferencja Chemii Analitycznej „Chemia analityczna to ciągle wyzwania” (2015) Poznań

#### **5f) Działalność dydaktyczna i popularyzująca naukę**

Na początku pracy w Państwowym Instytucie Weterynarii prowadziłam przeznaczone dla personelu laboratoriów badających żywność wykłady i szkolenia z podstaw chemii analitycznej oraz metod chemii klasycznej (oznaczanie azotanów, fosforanów, białka, tłuszczu, soli w żywności).

Od ponad 25 lat prowadzę szkolenia przeznaczone dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej z zakresu badań pozostałości hormonów i tyreostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego oraz walidacji metod. Jestem autorem 19 instrukcji metodycznych wdrożonych do badań w laboratoriach ZHW.

W latach 2007 - 2009 prowadziłam w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego w PIWet-PIB w Puławach wykłady na Specjalizacyjnym Studium Podyplomowym z zakresu „Weterynaryjna diagnostyka laboratoryjna”.

Od początku funkcjonowania Specjalizacyjnego Studium Podyplomowego prowadzę wykłady w WCKP w Puławach, SGGW w Warszawie oraz Uniwersytecie Przyrodniczym w Olsztynie w ramach specjalizacji „Higiena Zwierząt Rzeźnych i Żywności Zwierzęcego Pochodzenia” oraz „Administracja weterynaryjna” z zakresu urzędowej kontroli i występowania pozostałości hormonów anabolicznych i tyreostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego i w paszach.

Z tego też zakresu prowadzę wykłady w ramach szkoleń organizowanych przez Główny Inspektorat Weterynarii przeznaczonych dla Inspekcji Weterynaryjnej.

W ramach popularyzacji nauki wygłosiłam referat: „Problem hormonów anabolicznych w produkcji zwierzęcej – pozostałości, ryzyko dla konsumenta” na zebraniu PTToks w Lublinie w dniu 2012.03.17.

#### **5g) Opieka naukowa w charakterze promotora pomocniczego**

Sprawowałam opiekę naukową w charakterze promotora pomocniczego w przewodzie doktorskim: mgr inż. Macieja Marcina Durkalca; tytuł rozprawy doktorskiej:

„Zawartość kadmu, ołowiu oraz rtęci w tkankach zwierząt łownych, jako wskaźnik zanieczyszczeń środowiskowych i ważny element w strategii bezpieczeństwa żywnościowego” (154 posiedzenie Rady Naukowej PIWet-PIB, 21.11.2012).

Byłam też opiekunem naukowym doktorantki Elisy Pasquale z Università Degli Studi Di Milano Dipartimento Di Scienze Veterinarie e Santa Publica, Mediolan, Włochy, która przebywała na 3-miesięcznym stażu naukowym w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB w Puławach w 2015 r. Tematem stażu była analiza hormonów anabolicznych i tyreostatyków w próbkach pochodzenia zwierzęcego.

## 5 h) Odyte staże, szkolenia i kursy naukowe

### **Międzynarodowe:**

- Wielka Brytania, Cambridge, Szkolenie z podstaw chromatografii gazowej i obsługi chromatografu gazowego Anglia Instrument, 7 dni, 1988.
- Włochy, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana w Rzymie, Szkolenie obejmujące organizację i metody badań pozostałości hormonów i tyreostatyków w UE w ramach projektu PHARE PL0006.04 pt. Veterinary system for laboratories and diseases control, 13 dni, 2003.
- Niemcy, BgVV w Berlinie, warsztaty nt. zakresu prowadzenia testów międzylaboratoryjnych organizowanych przez unijne laboratoria: RIVM w Bilthoven i BgVV w Berlinie zorganizowane przez TAIEX OFFICE, 2 dni, 2003.
- Belgia, Bruksela, Working party of Laboratory Governmental Experts on Boldenone, 1 dzień, 2003.
- Holandia, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, warsztaty zorganizowane przez TAIEX “Consequences of the new EU Legislation for the Hormone Residue analysis”, 3 dni, 2003.
- Holandia, National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Laboratory for Food and Residue Analysis (ARO), Community Reference Laboratory (CRL), Indywidualne szkolenie z zakresu stosowania technik GC-MS i LC-MS w analizie hormonów w tkankach zwierzęcych, 5 dni, 2004.
- Holandia, National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Laboratory for Food and Residue Analysis (ARO), Community Reference Laboratory (CRL) , Bilthoven, warsztaty „ Evaluation Results Proficiency Tests and Technical Training”, 4 dni, 2004.
- Austria, szkolenie zorganizowane przez firmę NOACK pt. 2nd Central European Forum of Residue Analysis in Food, Wiedeń, 2 dni, 2004.
- Włochy, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” w Teramo, szkolenie „Methods of drug residues detection, part I” w ramach Phare project PL 01.04.05, 7 dni, 2004.
- Holandia, National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Laboratory for Food and Residue Analysis (ARO), Community Reference Laboratory (CRL) , Bilthoven, warsztaty „ 2005- annual CRL-NRL workshop”, 3 dni, 2005.
- Włochy, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Abruzzo e del Molise “G. Caporale” w Teramo, szkolenie „Confirmation methods in analysis of anabolic hormone,



residues and tyreostatics in tissues of slaughtered animals” w ramach Phare Project 2003/005-710.04.02, 14 dni, 2006.

- Holandia, National Institute of Public Health and Environment (RIVM), Laboratory for Food and Residue Analysis (ARO), Community Reference Laboratory (CRL) , Bilthoven, warsztaty „ RIVM - CRL annual workshop”, 2006, 2007, 2008, 2009.
- Holandia, Uczestnictwo w warsztatach organizowanych przez Unijne Laboratorium Referencyjne (EURL) w RIKILT Wageningen – „Annual EURL Workshop”, 2010, 2013, 2014.

#### **Krajowe:**

- Szkolenie „Analysis of chloramphenicol with Ridascreen Chloramphenicol kit”, Puławy, 2003.06.12-13;
- Szkolenie “Mass spectrometry Methods for New Challenges in the Screening of Pesticides , Metabolites and Unwanted Food Ingredients”, Puławy, 17.03. 2009.
- Seminarium “Advanced GC-Solution for Food and Beverage Analysis”, Puławy, 2010.11.19;
- Szkolenie ”A comparison of target and non-target screening using triple quadrupole and time of flight mass spectrometry, Puławy, 2011.02.16;
- “Warsztaty na temat platformy Web of Knowledge 5”, Thomson Reuters, Puławy, 05.12.2011;
- Szkolenia z obsługi zestawów LC i LC/MS/MS firm Varian, Shimadzu, Agilent i ABSciex, Puławy, 2005-2014;
- Szkolenie „ Ducares/KDLL Proficiency testing”, Puławy, 09.2014;
- Szkolenia z zakresu zapewnienia systemu jakości badań, Puławy, 2004-2011.

#### **5i) Recenzowanie publikacji w czasopismach naukowych**

Jestem autorem 15 recenzji prac złożonych do publikacji w czasopismach naukowych z bazy JCR:

*Journal of Separation Science (4), Analytical letters (1), Analytical, Bioanalytical Chemistry (1), Analytica Chimica Acta (1), Journal of Applied and Environmental Microbiology (1), Expert Review of Endocrinology & Metabolism (1), Food Analytical Methods (3), Chromatographia (2) oraz w czasopiśmie spoza bazy JRC: Facultad De Quimica Farmaceutica Revista Vitae (1)*

#### **5j) Inna działalność**

Byłam głównym współtwórcą Krajowego Programu Kontroli Pozostałości w zakresie badania pozostałości hormonów i tyreostatyków w tkankach zwierząt rzeźnych, który został wprowadzony w Polsce w 1990 roku. Brałam i biorę aktywny udział w przygotowanie, wdrożenie i realizację tego programu. Jestem odpowiedzialna za badania hormonów i tyreostatyków i nadzoruję pracę Krajowego Referencyjnego Laboratorium w tym zakresie.

W latach 2007-2015 zorganizowałam około 40 krajowych badań międzylaboratoryjnych przeznaczonych dla laboratoriów ZHW, a dotyczących oznaczania hormonów i tyreostatyków. Jestem również autorem raportów z tych badań.

Od 2006 roku współpracuję też z laboratorium EURL w Holandii (Bilthoven, Wageningen) koordynującym badania wymienionych związków na poziomie Unii Europejskiej.

Od 2003 roku brałam aktywny udział w tworzeniu systemu jakości w Zakładzie Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, a od 2007 roku w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB. Jestem autorem 23 procedur badawczych, z których obecnie stosowanych jest 11. Posiadam również uprawnienia audytora wewnętrznego systemu zarządzania jakością w laboratorium i uczestniczę w przeprowadzaniu auditów wewnętrznych w PIWet-PIB.

*Szczegółowy wykaz całości dorobku naukowego, wraz z informacjami o osiągnięciach naukowo badawczych znajduje się w Załączniku nr 3 i 4 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.*

