

AUTOREFERAT

Omówienie cyklu publikacji pt.

**„Opracowanie i zastosowanie nowych narzędzi analitycznych
w ocenie obecności, mobilności, trwałości i ekotoksyczności
wybranych leków w środowisku”**

Anna Białk-Bielińska

Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 2018

1. Imię i nazwisko: Anna Białk-Bielińska**2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej**

- **Doktor nauk chemicznych**

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, 15.02.2012

Tytuł rozprawy doktorskiej: *„Analityka i ocena ryzyka ekotoksykologicznego pozostałości sulfonamidów w środowisku”*

Promotor: prof. dr hab. Piotr Stepnowski

- **Inżynier**

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Kierunek studiów: Technologie Ochrony Środowiska, Specjalność: Analityka i Monitoring Środowiska, 25.02.2008

Tytuł pracy inżynierskiej: *„Oznaczanie pozostałości antybiotyków w próbkach środowiskowych”*

Promotor: prof. dr hab. Marek Biziuk

- **Magister Ochrony środowiska**

Uniwersytet Gdański, Wydział Chemii, Kierunek studiów: Ochrona środowiska, 11.06.2007

Tytuł pracy magisterskiej: *„Analiza hormonów sterydowych w moczu kobiety z zastosowaniem chromatografii gazowej (GC) i połączenia chromatografii gazowej ze spektrometrią mas (GC-MS)”*

Promotor: dr hab. Edmund Maliński, prof. UG

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2016 -	Kierownik Pracowni Chemicznych Zagrożeń Środowiska
2013 -	Kierownik Studiów Podyplomowych <i>„Ocena ryzyka substancji chemicznych w systemie REACH”</i> , Uniwersytet Gdański
2012 -	Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
2010 – 2012	Asystent, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański
2009 – 2012	Specjalista do spraw monitoringu i sprawozdawczości w ramach projektu <i>„Uniwersytet Gdański promotorem zasobów nowoczesnej gospodarki –</i>

zwiększanie liczby absolwentów kierunków przyrodniczych i ścisłych (PRO-GOS)”, Wydział Chemii, Uniwersytet Gdański

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. 2006 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. Z 2016 r. poz. 1311.):

A) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Cykl publikacji na temat:

„Opracowanie i zastosowanie nowych narzędzi analitycznych w ocenie obecności, mobilności, trwałości i ekotoksyczności wybranych leków w środowisku”

B) Autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

- [H1] M. Borecka M., **A. Białk-Bielińska***, G. Siedlewicz, K. Kornowska, J. Kumirska, P. Stepnowski, K. Pazdro, 2013. A new approach for the estimation of expanded uncertainty of results of an analytical method developed for determining antibiotics in seawater using solid-phase extraction disks and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry technique. *Journal of Chromatography A*, 1304, 138-146. **IF₂₀₁₃ = 4,258**
- [H2] M. Borecka, G. Siedlewicz, Ł.P. Haliński, K. Sikora, K. Pazdro, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska***, 2015. Contamination of the southern Baltic Sea waters by the residues of selected pharmaceuticals: method development and field studies. *Marine Pollution Bulletin*, 94, 62-71. **IF₂₀₁₅ = 3,099**
- [H3] **A. Białk-Bielińska***, J. Kumirska, M. Borecka, M. Caban, M. Paszkiewicz, K. Pazdro, P. Stepnowski, 2016. Selected analytical challenges in the determination of pharmaceuticals in drinking/marine waters and soil/sediment samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 121, 271-296. **IF₂₀₁₆ = 3,255**
- [H4] J. Maszkowska, S. Stolte, J. Kumirska, P. Łukaszewicz, K. Mioduszevska, A. Puckowski, M. Caban, M. Wagil, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska**, 2014. Beta-blockers in the

- environment: Part I. Mobility and hydrolysis study. *Science of the Total Environment*, 493, 1112-1121. **IF₂₀₁₄ = 4,099**
- [H5] K. Mioduszevska, J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska**, O. Krüger, U. Kalbe, B. Liberek, P. Łukaszewicz, P. Stepnowski, 2016. The leaching behavior of cyclophosphamide and ifosfamide from soil in the presence of co-contaminant - mixture sorption approach. *Science of the Total Environment*, 542, 915–922. **IF₂₀₁₆ = 4,900**
- [H6] J. Maszkowska, S. Stolte, J. Kumirska, P. Łukaszewicz, K. Mioduszevska, A. Puckowski, M. Caban, M. Wagil, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska**, 2014. Beta-blockers in the environment: Part II. Ecotoxicity study. *Science of the Total Environment* 493, 1122-1126. **IF₂₀₁₄ = 4,099**
- [H7] M. Wagil, **A. Białk-Bielińska***, A. Puckowski, K. Wychodnik, J. Maszkowska, E. Mulkiwicz, J. Kumirska, P. Stepnowski, S. Stolte, 2015. Toxicity of anthelmintic drugs (fenbendazole and flubendazole) to aquatic organisms. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 2566-2573. **IF₂₀₁₅ = 2,760**
- [H8] **A. Białk-Bielińska***, E. Mulkiwicz, M. Stokowski, S. Stolte, P. Stepnowski, 2017. Acute aquatic toxicity assessment of six anticancer drugs and one metabolite using biotest battery - Biological effects and stability under test conditions. *Chemosphere*, 189, 689-698. **IF₂₀₁₆=4,208**
- [H9] M. Borecka, **A. Białk-Bielińska***, Ł. P. Haliński, K. Pazdro, P. Stepnowski, S. Stolte, 2016. The influence of salinity on the toxicity of selected sulfonamides and trimethoprim towards green algae *Chlorella vulgaris*. *Journal of Hazardous Materials*, 308, 179-186. **IF₂₀₁₆ = 6,065**
- [H10] **A. Białk-Bielińska***, M. Caban, A. Pieczyńska, P. Stepnowski, S. Stolte, 2017. Mixture toxicity of six sulfonamides and their two transformation products to green algae *Scenedesmus vacuolatus* and duckweed *Lemna minor*. *Chemosphere*, 173, 542-550. **IF₂₀₁₆ = 4,208**
- [H11] A. Puckowski, S. Stolte, M. Wagil, M. Markiewicz, P. Łukaszewicz, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska**, 2017. Mixture toxicity of flubendazole and fenbendazole to *Daphnia magna*. *Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220, 575-582. **IF₂₀₁₆ = 4,643**
- [H12] **A. Białk-Bielińska***, M. Matzke, M. Caban, S. Stolte, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2017. Effects of five sulphonamides on duckweed (*Lemna minor*) after prolonged exposure time

and their dependency on photoradiation. *Science of the Total Environment*, 618, 952-960.

IF₂₀₁₆=4,900

(* autor korespondencyjny)

C) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

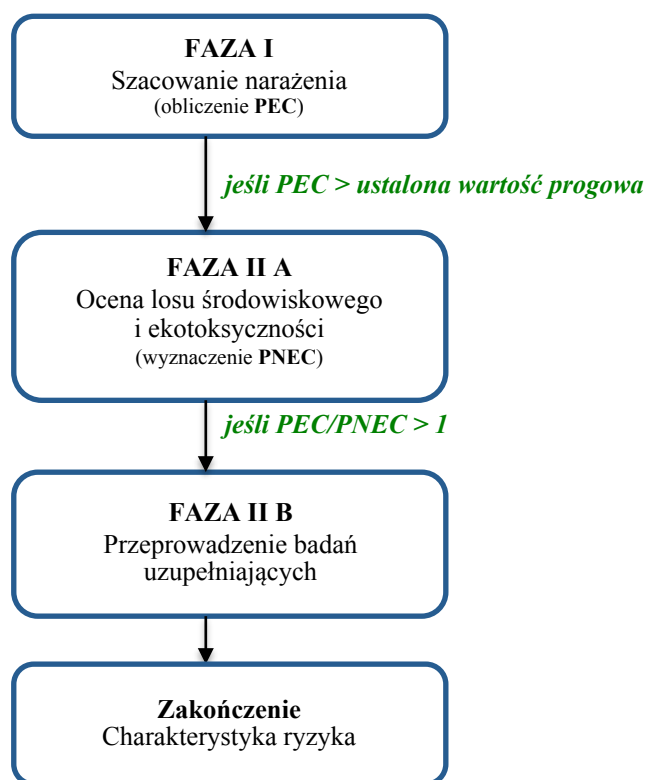
I. Wstęp

Farmaceutyki zaliczane są do tak zwanych „nowopojawiających” się zanieczyszczeń środowiska, przede wszystkim ze względu na fakt, iż są one szeroko stosowane w medycynie i weterynarii. Tym samym różnymi drogami z łatwością przedostają się do środowiska, gdzie mogą wywoływać określone efekty już w bardzo małych dawkach. Dzieje się tak dlatego, iż substancje lecznicze z natury rzeczy zostały tak zaprojektowane, aby posiadać określoną aktywność biologiczną odpowiadającą za właściwy efekt terapeutyczny. Po dotarciu do środowiska mogą one jednak wywoływać nietypowe skutki toksykologiczne u tzw. „organizmów niecelowych”. Często przytaczanym przykładem takiego efektu jest fakt wyginięcia ponad 95 % populacji sępa bengalskiego w Indiach w wyniku odżywiania się padliną krów leczonych diklofenakiem. Śmierć sępów nie była jednak wynikiem aktywności przeciwbólowej czy przeciwzapalnej tego leku, lecz wynikała z nieoczekiwanej ostrej niewydolności nerek tych ptaków [1]. Pomimo tego, iż stężenia leków w środowisku są bardzo małe (rzędu ng/l, µg/l) to ich stały dopływ w połączeniu z ich właściwościami fizykochemicznymi oraz aktywnością biologiczną może być wystarczający do wywołania negatywnych efektów toksykologicznych.

Badania nad obecnością pozostałości leków w środowisku prowadzone są od 20 lat, dlatego też stan wiedzy na ten temat znacząco się już poszerzył. Niedawno opublikowany raport niemieckiej Federalnej Agencji ds. Środowiska [2] podsumowuje ponad 1000 artykułów oryginalnych i prac przeglądowych w tym zakresie opublikowanych w minionym czasie. Wyniki tego przeglądu wskazują na obecność 631 aktywnych środków farmaceutycznych (lub ich metabolitów i produktów degradacji) w różnorodnych próbkach środowiskowych, z czego 17 substancji wykryto we wszystkich pięciu regionach Narodów Zjednoczonych. Mimo to, jeśli weźmie się pod uwagę liczbę ogólnie dostępnych aktywnych składników leków na rynku (sięgającą ok. 4000), to obraz ten w dalszym ciągu jest niepełny. Również dlatego, że brakuje

rzetelnych danych pozwalających na dokonanie pełnej oceny ryzyka środowiskowego (ang. *Environmental Risk Assessment*, ERA) tych substancji.

Biorąc pod uwagę obecnie obowiązujące wytyczne dotyczące ERA dla nowowprowadzanych na rynek produktów farmaceutycznych, podobnie jak dla innych substancji chemicznych, konieczne jest dostarczenie miarodajnych informacji zarówno na temat stopnia narażenia (oceny stopnia zanieczyszczenia środowiska oraz charakterystyki losu środowiskowego) jak i faktycznego zagrożenia (charakterystyki ryzyka ekotoksykologicznego). W chwili obecnej stosowane procedury ERA różnią się nie tylko w zależności od kraju, ale także od tego, czy dany lek stosowany jest w weterynarii (w krajach Unii Europejskiej: CVMP (2008) [3], VICH GL 6 (2000) [4], VICH GL 38 (2005) [5]) czy w medycynie (w krajach Unii Europejskiej: CHMP (2006) [6]). Jedynie dla leków weterynaryjnych obowiązują te same wytyczne w krajach Unii Europejskiej, Stanach Zjednoczonych i Japonii. Niezależnie od istniejących różnic w szczegółowych rozwiązaniach zalecanych procedur, ocena ryzyka środowiskowego produktów leczniczych może przebiegać w dwóch fazach (**Rysunek 1**).



Rysunek 1. Ogólny schemat postępowania w ocenie ryzyka środowiskowego substancji leczniczych, gdzie PEC – (ang. *Predicted Environmental Concentration*) przewidywane stężenie w środowisku, PNEC – (ang. *Predicted No-Effect Concentration*) przewidywane stężenie niewywołujące efektu toksycznego

Proces ERA produktów farmaceutycznych rozpoczyna się od wstępnej oceny narażenia (Faza I). Na tym etapie, w zależności od zastosowania danego leku, obliczana jest wartość parametru PEC, która odnosi się do przewidywanego stężenia substancji leczniczej: w glebie (PEC_{soil}) dla farmaceutyków stosowanych w weterynarii; w wodach powierzchniowych (PEC_{sw}) dla tych środków, które podawane są w medycynie; za wyjątkiem leków wykorzystywanych w hodowlach ryb, dla których obliczany jest analogiczny parametr – stężenie wprowadzane do środowiska, $EIC_{aquatic}$ (ang. *Environmental Introduction Concentration*). Powyższe wytyczne zawierają formuły matematyczne umożliwiające obliczenie wartości tych parametrów.

Niemniej jednak, poza pewnymi wyjątkami, analiza losu środowiskowego i skutków ekotoksykologicznych (Faza II) jest wymagana tylko wtedy, gdy obliczona wartość PEC będzie większa niż ustalone wartości progowe (ang. *action limits*), powyżej których szacuje się, że dana substancja lecznicza może wywierać znaczący wpływ na środowisko. Biorąc pod uwagę wytyczne obowiązujące w krajach UE badania takie podejmowane są gdy: $PEC_{soil} \geq 100 \mu\text{g/kg}$, $PEC_{sw} \geq 0,01 \mu\text{g/l}$ lub $EIC_{aquatic} \geq 1 \mu\text{g/l}$. Natomiast w Stanach Zjednoczonych takie działania są brane pod uwagę, gdy wartość $PEC_{sw} \geq 1 \mu\text{g/l}$, co wyraźnie pokazuje jak znaczące są różnice w podejściu do ERA leków w różnych krajach.

W drugiej fazie dokonuje się oceny losu środowiskowego oraz ryzyka ekotoksykologicznego zarówno dla leków stosowanych w weterynarii, jak i medycynie, zgodnie z procedurami tj. OECD, ISO. Dzięki przeprowadzonym badaniom ekotoksykologicznym w Fazie II A możliwe jest wyznaczenie parametru PNEC, który jest kluczowy do obliczenia współczynnika ryzyka (ang. *Risk Quotient*, RQ) – jako stosunku przewidywanego stężenia środowiskowego (PEC) i przewidywanego stężenia niepowodującego zmian (PNEC). Czasami zamiast parametru PEC (o ile dostępne są takie dane), brane jest pod uwagę wyznaczone stężenie danego leku w środowisku (ang. *Measured Environmental Concentration*). Ostatecznie jeśli $RQ < 1$, nie oczekuje się negatywnego wpływu danego leku na środowisko.

Należy podkreślić, iż zaproponowane w omawianych dokumentach badania ekotoksykologiczne (przewidziane w Fazie II A) odnoszą się tylko do trzech typów organizmów (tj. ryb, glonów i bezkręgowców). Eksperymenty z wykorzystaniem innych gatunków dokonywane są tylko wówczas, gdy stwierdzony zostanie negatywny wpływ badanej substancji na wcześniej wspomniane organizmy. Ponadto, pod uwagę brana jest tylko ocena toksyczności substancji występujących pojedynczo. Nie uwzględnia się ani oceny toksyczności mieszanin ani toksyczności chronicznej, pomimo tego, że substancje te występują w środowisku zwykle właśnie w mieszaninach, a także w sposób ciągły wprowadzane są do ekosystemu, przez co

mogą wywierać także negatywne skutki długofalowe. Odzwierciedleniem tego są dane zamieszczone w powszechnie dostępnej bazie WikiPharma (www.mistrpharma.se) przedstawiające wyniki dotychczas przeprowadzonych badań ekotoksykologicznych leków. Najwięcej dostępnych informacji odnosi się do bezkręgowców *Daphnia magna* (29,1 % wszystkich przeprowadzonych testów), *Ceriodaphnia dubia* (6,9 %), *Thamnocephalus platyurus* (5,5 %), a następnie dla bakterii (*Vibrio fischeri*, 12 %), glonów (*Raphidocelis subcapitata* wcześniej *Pseudokirchneriella subcapitata*, 9,5 %) oraz ryb (8,7 %). Ponadto, zebrane tam informacje, wskazują, że testy toksyczności ostrej oparte na mikroorganizmach (czas ekspozycji ≤ 30 min), glonach (czas ekspozycji ≤ 72 h), bezkręgowcach (czas ekspozycji ≤ 48 h) i kręgowcach (czas ekspozycji ≤ 96 h) stanowią 55 % wszystkich zebranych danych [7]. Informacja ta została potwierdzona także przez Santos'a i współpracowników [8], którzy wykazali, że testy toksyczności ostrej stanowią więcej niż 60 % wszystkich przeprowadzonych testów ekotoksyczności leków.

Z tych właśnie powodów w literaturze przedmiotu trwa ożywiona dyskusja nad poprawnością ustalonych wartości progowych stężeń leków w środowisku, powyżej których taką ocenę należy wykonywać czy też poprawnej interpretacji wyników analiz ekotoksykologicznych.

Dlatego też głównym celem podjętych badań, wyniki których zawarto w niniejszym osiągnięciu naukowym, było dostarczenie możliwie największej ilości miarodajnych danych, które pozwoliłyby w przyszłości na dokonanie pełnej i rzetelnej oceny ryzyka środowiskowego wybranych grup leków trafiających do środowiska. Przeprowadzone w tym zakresie badania można podzielić między trzy główne obszary: (i) pierwszy i jednocześnie nadrzędny związany był z opracowaniem szeregu metod i procedur analitycznych do oznaczania wybranych substancji z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną i/lub opartą o spektrometrię mas. Opracowane narzędzia analityczne wykorzystane zostały m.in. do (ii) oceny stopnia zanieczyszczenia wód morskich strefy przybrzeżnej południowego Bałtyku oraz do ilościowego opisu procesów związanych z oceną mobilności i stabilności wybranych grup leków, a także do (iii) ilościowego i jakościowego opisu obserwowanych efektów biologicznych w przeprowadzonych testach ekotoksykologicznych.

Obiektem badań objęto 26 leków powszechnie stosowanych w medycynie i/lub weterynarii, należących do różnych grup leczniczych i ich wybrane produkty transformacji.

II. Opis osiągnięć naukowych

W literaturze przedmiotu można odnaleźć znaczną liczbę publikacji przedstawiających dokonania wielu autorów w zakresie opracowywania nowych metodyk analitycznych przeznaczonych do oznaczania pozostałości wybranych leków w próbkach środowiskowych. Mimo to, prace te na ogół odnoszą się do analityki tych substancji w ściekach surowych i oczyszczonych oraz w wodach powierzchniowych. Natomiast odpowiednie rozwiązania metodologiczne do oznaczeń tych analitów w glebach, osadach dennych, a zwłaszcza w wodach morskich i estuariowych są znacznie mniej dostępne. W odniesieniu do matryc stałych jest to najprawdopodobniej związane ze znacznie większą trudnością dobrania odpowiednich warunków izolacji i wzbogacania analitów, tym samym zapewniania odpowiednio efektywnych warunków ekstrakcji do ich wiarygodnego oznaczania. Z kolei w przypadku próbek wód morskich stosunkowo długo istniało przekonanie, że na skutek wysokiego rozcieńczenia, do jakiego dochodzi po przedostaniu się takich substancji do zbiornika morskiego, zagrożenie jakie one za sobą niosą jest niskie, a zatem nie było brane pod uwagę. Jeśli jednak weźmie się pod uwagę choćby uwarunkowania hydrologiczne mórz takich jak Bałtyk, charakteryzującego się znacząco ograniczoną wymianą wód z Morzem Północnym, można przez analogię do typowych zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych założyć, iż również w przypadku tzw. „nowopojawiających się” czy „pseudo-trwałych” zanieczyszczeń może dochodzić do znaczącej ich kumulacji zwłaszcza w strefie przybrzeżnej. Oczywiście pod uwagę należy także wziąć fakt, iż substancje te po przedostaniu się do środowiska morskiego będą mogły podlegać różnorodnym przemianom biotycznym i abiotycznym (tj. biodegradacji, hydrolizie czy fotolizie) czy też sorpcji do osadów i zawiesin. Mimo tego fakt, iż są one wprowadzane w sposób ciągły, zagrożenie, jakie mogą za sobą nieść nie powinno być lekceważone.

Biorąc pod uwagę powyższe, a także bardzo ograniczony stan wiedzy na temat stopnia zanieczyszczenia wód morskich (nie tylko Morza Bałtyckiego, ale także innych zbiorników morskich na całym świecie) istniała potrzeba dysponowania odpowiednimi narzędziami analitycznymi pozwalającymi na oznaczanie pozostałości wybranych leków w tego typu próbkach środowiskowych na odpowiednio niskich poziomach stężeń oraz przy stosunkowo wysokim zasoleniu. W tym kontekście niezmiernie ważne stało się także zaproponowanie takich rozwiązań metodologicznych, które prowadziłyby do uzyskiwania miarodajnych wyników analitycznych. Zapewnienie bowiem odpowiedniej wiarygodności i jakości uzyskiwanych danych jest w dalszym ciągu „piętą Achilleś” w wielu dostępnych doniesieniach literaturowych. Niejednokrotnie bowiem procedura walidacyjna opisana jest w sposób bardzo lakoniczny,

a analiza jakościowa przeprowadzona jest w oparciu o niewystarczające kryteria. Autorzy nie definiują także jak wyznaczyli wartości odzysku. Wszystko to uniemożliwia rzetelne porównywanie prezentowanych w literaturze rozwiązań analitycznych. Ponadto, poza dwoma artykułami naukowymi [9-10] autorzy analizowanych prac całkowicie pomijają wyznaczenie rozszerzonej niepewności uzyskiwanych wyników oznaczeń pozostałości leków w próbkach środowiskowych, mimo tego, że jest to niezmiernie ważne w przypadku oznaczania jakichkolwiek śladowych zanieczyszczeń środowiska.

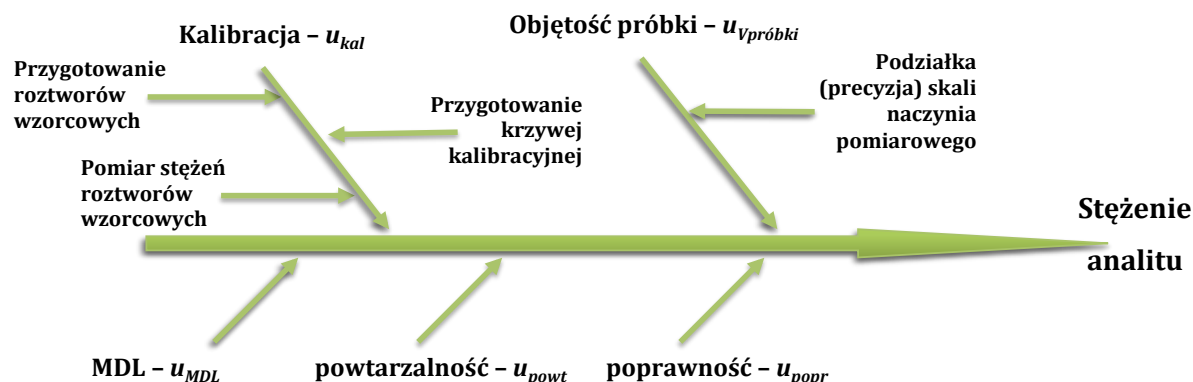
Z tych względów zadania badawcze w obszarze analitycznym w pierwszej kolejności zostały skierowane na opracowanie autorskiej metodyki oznaczania wybranych leków w próbkach wód morskich z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) [H1-H2]. W pracach tych po raz pierwszy zaproponowano nowe podejście metodologiczne do oznaczania pozostałości leków w próbkach środowiskowych. Istniało bowiem podejrzenie, że substancje te wraz ze spływem wód powierzchniowych, jak i wodami odprowadzanymi z hodowli ryb prowadzonych wzdłuż strumieni rzek pomorskich, czy wraz z odprowadzanymi ściekami oczyszczonymi, wprowadzane mogą być do ekosystemu morskiego i estuariowego.

W pierwszej kolejności obiektem badań były wybrane antybiotyki powszechnie stosowane głównie w weterynarii (trimetoprim, sulfatiazol, sulfapyrydyna, enrofloksacyna, sulfamerazyna, sulfametazyna, sulfametiazol, sulfachloropirydazyna, sulfametoksazol, sulfisoksazol i sulfdimetoksyna) [H1]. Oprócz dobrania odpowiednich warunków rozdzielania chromatograficznego (**Rysunek 2**, [H1]), które w przyszłości umożliwiły dołączenie kolejnych analitów do jednego przebiegu analizy ([H2]) najważniejszym wyzwaniem stało się opracowanie właściwej dla śladowych zawartości analitów analizy ilościowej. Oparto ją o tryb monitorowania wybranych reakcji fragmentacji (MRM), biorąc pod uwagę charakterystyczne przejścia jon pseudomolekularny – jon fragmentacyjny (**Tabela 1**, [H1]). Ponieważ różnorodne składniki poszczególnych próbek mogą wywierać znaczący wpływ zarówno na efektywność ekstrakcji (EE) i efekty matrycowe (ME) obserwowane w źródle jonów, a zatem i na wartość odzysku bezwzględnego (AR), wyznaczano te parametry nie tylko na etapie dobierania warunków ekstrakcji (**Tabela 2**, [H1]), ale także każdorazowo podczas analizy każdej próbki. Miało to na celu zapewnienie odpowiedniej jakości i wiarygodności uzyskiwanych wyników.

Oprócz rozbudowanej metodyki walidacyjnej czynnikiem odróżniającym zaprezentowane podejście analityczne [H1] od podobnych rozwiązań było odmienne podejście do selektywnej ekstrakcji tych związków z wody morskiej, poprzez wykorzystanie dysków do

przyspieszonej ekstrakcji (ang. SPE *speed disks*). Ich geometria oraz mniejsza średnica ziarna (8 – 12 μm) niż w klasycznych kolumnkach SPE (40 – 80 μm), powodują iż charakteryzują się one większą powierzchnią sorpcyjną, a także pozwalają na zastosowanie większych przepływów, prowadząc tym samym do możliwości ekstrahowania próbek o większej objętości w krótszym czasie. W efekcie prowadzi to do obniżenia granic oznaczalności i wykrywalności – co ma szczególne znaczenie w analizie próbek wód morskich. Aby zapewnić odpowiednie warunki tejże ekstrakcji przetestowano kilka metod (**Tabela 2**, [H1]). Dobrano je na podstawie dostępnych danych literaturowych dla innych analitów, jak i wcześniejszych doświadczeń. Za najlepszą metodę uznano Metodę 4 (**Tabela 2 i 3**, [H1]), która charakteryzowała się nie tylko satysfakcjonującymi wartościami EE ($> 50\%$), ale także ME ($-50\% < ME < 50\%$) i tym samym AR ($> 30\%$). Kluczowym aspektem w obniżeniu obserwowanej wysokiej wartości efektów matrycowych (głównie tłumienia jonizacji analitów) na skutek obecności szeregu substancji przeszkadzających było wprowadzenie dodatkowego etapu przemycia heksanem, co znalazło już wcześniej swoje zastosowanie także do ekstrakcji beta-blokerów i beta-antagonistów z próbek środowiskowych [11].

Opracowaną metodykę poddano procesowi walidacji. Jednakże, tak jak wcześniej wspomniano, w celu zapewnienia jak najwyższej jakości prezentowanych tego typu wyników badań, w pracy tej [H1] po raz pierwszy przedstawiono cały proces obliczenia rozszerzonej niepewności (**Rozdział 2.7, Tabela S2** [H1]), opierając się o tak zwany Diagram Ishikawy (**Rysunek 2**). Prezentuje on wpływ niepewności poszczególnych parametrów procesu analitycznego na wartość całkowitej niepewności wyniku końcowego oznaczania wybranych farmaceutyków w próbkach środowiskowych.



gdzie:

u_{kal} – niepewność związana z etapem kalibracji,

$u_{(Vpróbkki)}$ – niepewność związana z wyznaczeniem objętości próbki przeznaczonej do przeprowadzenia procesu ekstrakcji,

u_{MDL} – niepewność wyznaczenia stężenia analitu dla ślepej próbki (zależna od wyznaczonej granicy wykrywalności),

u_{powt} – niepewność związana z powtarzalnością uzyskiwanych wyników analitycznych,

u_{popr} – niepewność związana z wyznaczeniem poprawności opracowanej metodyki.

Rysunek 2. Diagram Ishikawy dla opracowanej procedury analitycznej

Ostatecznie wyznaczone parametry metrologiczne, jak i wartość rozszerzonej niepewności (**Tabela 4**, [H1]) świadczyły o wysokiej aplikacyjności zaproponowanej metodyki analitycznej. Została ona wykorzystana do przeprowadzania pionierskich badań nad oceną stopnia zanieczyszczenia wód morskich strefy przybrzeżnej południowego Bałtyku, udowadniając obecność pozostałości różnych substancji leczniczych w szerokim zakresie stężeń.

W dalszym etapie opracowaną metodykę poddano modyfikacji i ostatecznie znalazła ona swoje zastosowanie do oznaczania następujących leków: trimetoprim, sulfapyrydyna, sulfatiazol, enrofloksacyna, sulfamerazyna, sulfametazyna (sulfadimidina), sulfametoksazol, kwas oksolinowy, sulfadimetoksyna, ketoprofen, naproksen, ibuprofen i diklofenak. Do oznaczeń końcowych wykorzystano technikę LC-MS/MS w trybie MRM, opierając się na monitorowaniu aż trzech charakterystycznych przejść dla danego analitu (**Tabela S1**, [H2]). Także i tu wyznaczono satysfakcjonujące parametry ME, AR, oraz EE oraz rozszerzoną niepewność otrzymywanych wyników analitycznych (**Tabela 3** [H2]), a metodę zastosowano do oznaczeń farmaceutyków w wodach morskich wzdłuż całego wybrzeża Polski północnej (**Rysunek 1**, **Tabela 2**, [H2]) w 17 punktach uwzględniających wyznaczenie stężeń wybranych leków nie tylko w profilach poziomych, ale i pionowych. Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej omawianych wyników (**Rozdział 2.6 i 3.1.1**, **Tabela S3** oraz **Rysunki S1-S3** [H2]) nie stwierdzono jednak bardzo wyraźnych zależności pomiędzy wyznaczonymi wartościami parametrów ME, AR czy EE badanych próbek a ich zasoleniem czy zawartością materii

zawieszanej, co dowodzi wpływu innych parametrów fizyko-chemicznych wód na wielkość tych parametrów.

Uzyskane wyniki analiz (**Tabela 4a i 4b**, [H2]) wskazują na powszechną obecność różnorodnych leków w pobranych próbkach wód morskich, w stężeniach sięgających od kilku do ponad stu ng/l. Trimetoprim wykryto w 95 % analizowanych próbek, zaś sulfametoksazol i enrofloksacynę odpowiednio w 68 % i 59 %. Częstotliwość wykrywania pozostałych leków mieściła się w zakresie od 4 do 40 %, co wynika najprawdopodobniej z ich odmiennego zachowania się (stabilności) w warunkach środowiskowych. Ponadto potwierdzono, że najwyższe stężenia badanych substancji znajdują się w sąsiedztwie ujść rzek i wylotów kolektorów ścieków oczyszczonych. O ile nie zaobserwowano znaczących zmian w stężeniach leków wraz z głębokością, to dla niektórych substancji potwierdzono malejący gradient stężeń wraz oddalaniem się od brzegu czy ujść rzek, które zdają się być kluczowym źródłem leków w środowisku morskim.

W toku prowadzonych prac opracowano także szereg innych metodyk analitycznych, które pozwoliły na dokonanie oceny stopnia zanieczyszczenia różnych komponentów środowiska, ze szczególnym uwzględnieniem gleb, osadów dennych, osadów morskich oraz wód i tkanek ryb. Opublikowane wyniki badań w tym zakresie weszły w skład dorobku uzupełniającego – opisanego w dalszej części niniejszego Autoreferatu.

Wszystkie opracowane metody analityczne oraz ich kolejne modyfikacje zostały wykorzystane w dalszym toku badań do ilościowej oceny badanych procesów sorpcji i stabilności w przeprowadzonych badaniach modelowych jak i próby wyjaśnienia obserwowanych efektów biologicznych w zrealizowanych eksperymentach ekotoksykologicznych [H4-H12]. Każdą z zastosowanych metod analitycznych poddawano po raz kolejny procesowi walidacji obejmującej wyznaczenie liniowości, zakresu pomiarowego, precyzji, prawdziwości, granicy wykrywalności i oznaczalności wobec danej matrycy analitycznej. Dokładny opis tych metod oraz ich wyznaczone parametry walidacyjne zostały zamieszone w publikacjach [H4-H12] i schematycznie podsumowane w **Tabeli 1**.

Zebrane w toku przeprowadzonych badań analitycznych doświadczenie oraz zdobyta wiedza stały się podstawą pracy przeglądowej [H3], prezentującej najważniejsze wyzwania w analityce pozostałości farmaceutyków w wybranych komponentach środowiska tj. wodach morskich i pitnych, glebach i osadach dennych.

Tabela 1. Wykaz opracowanych i zastosowanych w toku badań metod oznaczania końcowego wybranych leków i ich produktów transformacji

Analityt	Wykorzystana technika	Publikacja	Opis dobranych warunków metody analitycznej	Charakterystyka parametrów walidacyjnych
propranolol, metoprolol, nadolol	HPLC-UV	[H4]	Rozdział 2.4 (zarówno do badań sorpcyjnych oraz hydrolitycznych)	Tabela 1S (badania sorpcyjne) Tabela 2S (badania hydrolityczne)
cyklofosfamid, ifosfamid, metoprolol	HPLC-UV	[H5]	Rozdział 2.5 (dla metoprololu warunki jak w [H4])	Rozdział 2.5 (dla metoprololu parametry takie jak w [H4])
propranolol, metoprolol, nadolol	HPLC-UV	[H6]	Rozdział 2.3 (warunki takie jak w [H4] dla badań sorpcyjnych)	Tabela 1S (badania ekotoksykologiczne)
fenbendazol, flubendazol	HPLC-DAD	[H7]	Rozdział „Materials and Methods - Instrumental analysis”	Rozdział „Results and Discussion-Instrumental Analysis”
5-fluorouracyl, cyklofosfamid, ifosfamid, imatynib, metotreksat, 7-hydroksymetotreksat, tamoksyfen	HPLC-UV/ LC-MS/MS	[H8]	Tabela 2A	Tabela 2A
sulfametoksazol, sulfadimetoksyna, sulfapirydyna, trimetoprim	HPLC-UV	[H9]	Tabela 2	Tabela 2
sulfametoksazol, sulfadimetoksyna, sulfapirydyna, sulfadimidyna, sulfatiazol, sulfanilamid, kwas sulfanilowy	HPLC-DAD	[H10]	Tabela A2 (modyfikacja warunków z [H9])	Tabela A2
mieszanki fenbendazolu i flubendazolu	HPLC-DAD	[H11]	Rozdział 2.7 (warunki takie same jak w [H7])	Parametry walidacyjne takie jak w pracy [H7]
sulfametoksazol, sulfadimetoksyna, sulfapirydyna, sulfadimidyna, sulfatiazol, sulfanilamid, kwas sulfanilowy	HPLC-UV/ LC-MS/MS	[H12]	Tabela 2 (modyfikacja warunków z [H10])	Tabela 2

Niemal zawsze ostatecznym rezerwuarem zanieczyszczeń farmaceutycznych stają się wody naturalne, zarówno powierzchniowe jak i podpowierzchniowe. Należy jednak pamiętać, iż istotnym środowiskowym komponentem transportowym i depozycyjnym są gleby. Środowisko to jest szczególnie narażone na te zanieczyszczenia w przypadku, gdy dochodzi do jego użyźniania z użyciem osadu czynnego czy obornika zanieczyszczonego pozostałościami leków. Udowodniono, że stężenie leków w gruntach uprawnych traktowanych nawozem naturalnym może sięgać od kilku do nawet kilku tysięcy $\mu\text{g}/\text{kg}$ [12]. Transport chemikaliów w środowisku

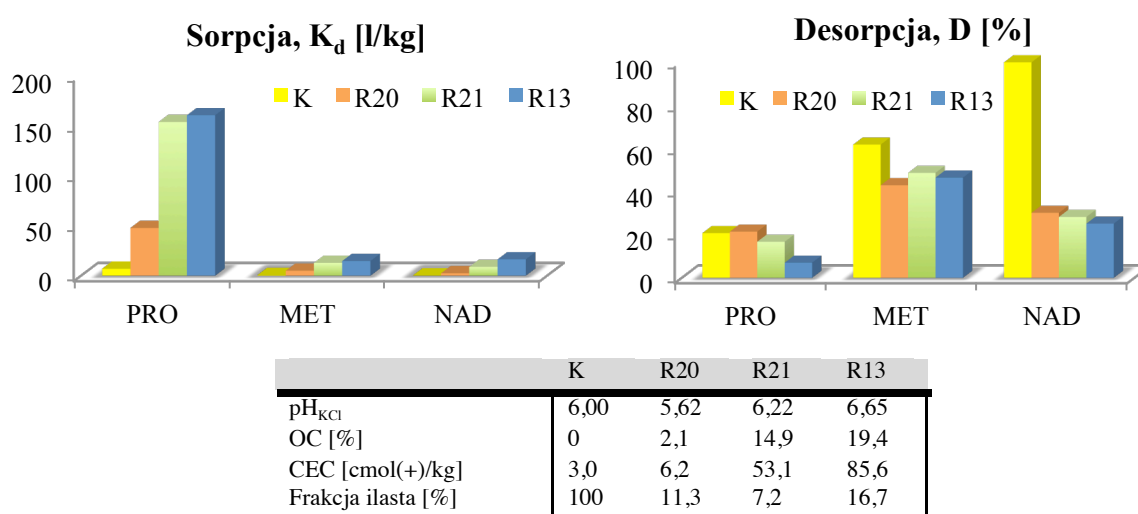
glebowym zależy od intensywności ich sorpcji na powierzchni cząstek gleby. Natomiast proces sorpcji wpływa bezpośrednio na biodostępność tych substancji chemicznych, a zatem odgrywa kluczową rolę w ocenie narażenia organizmów żywych na ich obecność w środowisku.

Z tych względów, w dalszej części badań dokonano po raz pierwszy szczegółowej oceny mobilności wybranych leków należących do dwóch powszechnych grup terapeutycznych (beta-blokerów [H4] i leków cytostatycznych [H5]). Badania nad oceną potencjału sorpcyjnego beta-blokerów poszerzono dodatkowo o ich ocenę stabilności hydrolytycznej [H4], która do tej pory nie była przedmiotem szczegółowych badań.

Beta-blokery (BB) należą do grupy leków beta-adrenolitycznych powszechnie stosowanych w leczeniu chorób kardiologicznych, zwłaszcza w leczeniu nadciśnienia tętniczego oraz chorobie niedokrwiennej serca. Znajdują one także swoje zastosowanie w weterynarii oraz nielegalnie jako środki dopingujące w sporcie. Ich zużycie na świecie jest bardzo wysokie, np. w Niemczech sięga 100 ton rocznie [13]. Wiadomo, iż część z nich jest w niewielkim stopniu wchłaniana przez organizm i jedynie częściowo metabolizowana oraz, że ich efektywność usuwania na etapie oczyszczania ścieków jest niewielka. Wszystko to powoduje, że w wielu regionach świata są one wykrywane w różnych komponentach środowiska na poziomie stężeń $\mu\text{g/l}$. Mimo tego wiedza na temat ich zdolności do kumulowania się w mediach porowatych, ze szczególnym uwzględnieniem gleb naturalnych, jest niewielka. Ze względu na powszechność stosowania oraz wykrywania w próbkach środowiskowych (**Tabela 1**, [H4]) do badań wytypowano trzy leki należące do tej grupy: metoprolol (MET), propranolol (PRO) oraz nadolol (NAD).

Badania nad oceną potencjału sorpcyjnego wybranych przedstawicieli BB przeprowadzono zgodnie z procedurą OECD 106 [14] (**Rysunek 1S_część A**, [H4]) w warunkach testu statycznego (ang. *batch test*) z wykorzystaniem trzech typów gleb różniących się parametrami fizykochemicznymi (R20, R13, R21) (**Tabela 2**, [H4]). Pulę gleb uzupełniono o kaolinit – minerał ilasty, który dzięki braku materii organicznej stanowi doskonały materiał referencyjny odzwierciedlający jedynie oddziaływania z frakcją mineralną. Test statyczny jest cennym narzędziem do wyznaczenia równowagowego współczynnika adsorpcji K_d , który charakteryzuje podział związku chemicznego pomiędzy fazę wodną a stałą, a zatem jego wyznaczenie opiera się na stałym stosunku gleba/roztwór wodny. Jest on niezwykle przydatny do określenia wpływu zmiennych warunków środowiskowych na proces sorpcji danej substancji, tj. pH, siły jonowej roztworu glebowego czy temperatury panującej w układzie.

Uzyskane wyniki badań (**Rysunek 1** i **Tabela 3**, [H4]), schematycznie zaprezentowane również na **Rysunku 3**, pozwoliły jednoznacznie wskazać, iż mobilność tych leków w środowisku glebowym maleje wraz ze wzrostem ich hydrofobowości ($\log P_{\text{PRO}} = 3,48$; $\log P_{\text{MET}} = 1,95$; $\log P_{\text{NAD}} = 0,81$) oraz wzrostem zawartości materii organicznej (OC) i pojemności wymiany kationowej gleby (CEC) (**Tabela 3**, [H4]). Najwyższe wartości równowagowych współczynników sorpcji i najniższą wartość stopnia desorpcji zaobserwowano dla gleby R13, charakteryzującej się największymi wartościami wymienionych parametrów. Natomiast dla kaolinitu – sorbentu niezawierającego materii organicznej – wartości K_d były najniższe, a stopień desorpcji najwyższy.



Rysunek 3. Wyznaczone wartości równowagowych współczynników adsorpcji oraz stopień desorpcji BB w warunkach przeprowadzonego eksperymentu zgodnie z wytycznymi OECD 106 (rysunek sporządzony na podstawie danych przedstawionych w **Tabeli 2 i 3** w [H4])

Wykazano także, że sorpcja BB do gleb jest tylko częściowo odwracalna (maksymalny stopień desorpcji z gleby wyniósł $48,6 \pm 1,4$ %), zaś ich desorpcja jest odwrotnie proporcjonalna do wzrastającej zawartości materii organicznej w glebie. Wyznaczone wartości K_d pozwalają na stwierdzenie, że BB charakteryzują się mniejszą mobilnością, a tym samym i mniejszą biodostępnością, co może ograniczać ich przedostawanie się w głąb obszarów wodonośnych niż np. sulfonamidy [15-16]. Podejmując próbę opisu uzyskanych wyników eksperymentalnych oraz ustalenia mechanizmu sorpcji wybranych BB do gleb wykazano, że spośród czterech izoterm (Freundlicha, Langmuira, Dubinia-Radushkevicha, Temkina) (**Rysunek 3S-5S**, [H4]) najlepsze dopasowanie występuje w przypadku zastosowania izotermi Freundlicha (**Tabela 4**, [H4]). Mimo iż izotermi Dubinina-Radushkevicha i Temkina wykazały gorsze dopasowanie, wskazują one równocześnie na małe prawdopodobieństwo istnienia chemisorpcji czy też oddziaływania

wynikającego z przeniesienia ładunku (izoterma Temkina). Pomimo iż związki te, w oparciu o ich właściwości kwasowo-zasadowe, są organicznymi zasadami i w warunkach eksperymentu (**Rysunek 2S**, [H4]) występowały w postaci kationu, izoterma Dubinina-Radushkevicha nie wykazała dobrego dopasowania do danych eksperymentalnych. Wiąże się to najprawdopodobniej z dalece bardziej złożoną strukturą chemiczną (różnorakie możliwości oddziaływań molekularnych) niż proste kationy nieorganiczne, dla których model izoterm Dubinina-Radushkevicha jest zwykle dobrze dopasowany (obliczona wartość średniej energii swobodnej E_D w układzie potwierdzałaby istnienie oddziaływań jonowych). Ponadto, biorąc pod uwagę wartości K_d innych silnie sorbowanych substancji, dla których opisany mechanizm wymiany jonowej został potwierdzony w wyznaczonych wartościach średnich energii swobodnej E_D oraz wyznaczone wartości tego parametru dla BB, można sądzić, iż są one zbyt małe dla jednoznacznego potwierdzenia wymiany jonowej matematycznym modelem. Można zatem podejrzewać, iż w przypadku BB dodatkowo mogą występować oddziaływania donorowo-akceptorowe, typu $\pi - \pi$ czy wiązania wodorowe. Dalsza interpretacja izoterm wskazała, iż sorpcja BB na heterogenicznej powierzchni może mieć także charakter wielowarstwowy.

Wyraźny spadek potencjału sorpcyjnego BB w $\text{pH} > \text{pK}_a$ tych leków (a zatem wraz ze zmniejszającym się udziałem formy kationowej na korzyść formy obojętnej) (**Rysunek 2**, [H4]) jak i wraz ze wzrostem siły jonowej (**Rysunek 3**, [H4]) pozwolił jednoznacznie wskazać, iż mechanizm wymiany jonowej jest wysoce prawdopodobny. Leki te bowiem są związkami o charakterze zasadowym, a zatem w pH poniżej ich pK_a występują w formie kationu – silnie oddziaływującego z ujemnie naładowaną powierzchnią gleby (**Rysunek 2S**, [H4]). Wyjaśnia to także obserwowany spadek potencjału sorpcyjnego wraz ze wzrostem siły jonowej, czyli wraz ze wzrostem zawartości jonów Ca^{2+} w roztworze wodnym konkurujących z kationami BB o miejsca aktywne na powierzchni gleby.

Badania nad oceną potencjału sorpcyjnego BB rozszerzono o ocenę ich stabilności hydrolitycznej zgodnie z wytycznymi OECD 111 [17] (**Rysunek 1S_część B**, [H4]). Na podstawie uzyskanych wyników badań (**Rysunek 4**, [H4]) po raz pierwszy udowodniono, że substancje te wykazują wysoką odporność do ulegania procesowi hydrolizy w warunkach środowiskowych ($t_{1/2} > 1$ rok w temperaturze $25\text{ }^\circ\text{C}$), dostarczając tym samym wiarygodnych danych na temat ich zachowania się w ekosystemie. Mając na uwadze ich relatywnie wysoką odporność hydrolityczną, a także ograniczoną immobilizację w strukturach gleby (porównując wyznaczone wartości współczynników K_d dla BB ($K_d < 160,8$ l/kg) do innych typowych zanieczyszczeń środowiska ($K_d > 1000$ l/kg) można sądzić, iż substancje te będą kumulowały się

w środowisku wodnym. Z tych też względów badane leki wzięto pod uwagę w przeprowadzonych badaniach ekotoksykologicznych, mających na celu scharakteryzowanie zagrożeń jakie one niosą za sobą wobec wybranych organizmów [H6], co zostanie omówione w dalszej części Autoreferatu.

Podjęto także udaną próbę oceny mobilności dwóch wybranych leków stosowanych w terapiach przeciwnowotworowych nie tylko z wykorzystaniem testu w układzie statycznym, ale także dynamicznym (ang. *column test*) [H5] w oparciu o procedury zaproponowane przez Niemiecki Instytut Normalizacyjny odpowiednio E DIN 19527 [18] i DIN 19528 [19]. Są to pierwsze tego typu badania na Świecie. Eksperymenty te prowadzono z wykorzystaniem dwóch rodzajów gleb różniących się parametrami fizykochemicznymi (**Tabela A.1**, [H5]): piasku ilastego (LS) i piasku o średnim uziarnieniu (MS). Obiektem badań objęto dwa najczęściej stosowane w terapiach przeciwnowotworowych leki: cyklofosfamid (CK) i ifosfamid (IF), które stosowane są od wielu lat. Leki cytostatyczne, do których są one zaliczane, ze względu na swoją wysoką aktywność (prowadzą one do inhibicji syntezy DNA w komórce), cytotoksyczność i genotoksyczność [20], uważa się, iż mogą one stanowić bardzo poważne zagrożenie nie tylko dla organizmów żyjących w środowisku, ale pośrednio także dla zdrowia człowieka. Mimo to, stan wiedzy na temat obecności, losu oraz zagrożeń, jakie mogą one nieść jest niewielki.

Na podstawie uzyskanych wyników badań, stwierdzono, że CK i IF wykazują znacznie większą zdolność do przenikania do wód gruntowych niż omawiane wcześniej beta-blokery. Wymywane są one z kolumn glebowych już w pierwszej frakcji o stosunku fazy wodnej do glebowej L/S wynoszącym 0,3 l/kg dla gleby MS (90 % wymycie) oraz w drugiej frakcji o L/S 0,75 l/kg dla gleby LS (90 % wymycie) (**Rysunek A.1 i A.2**, [H5]). Na tej podstawie zaobserwowano, że wymywanie było wolniejsze w przypadku gleby LS, co sugeruje, że sorpcja CK i IF jest preferowana w glebach o większej zawartości materii organicznej, jak i większym udziale frakcji ilastej.

W badaniach tych uwzględniono także ocenę wpływu obecności innego zanieczyszczenia na zachowanie się tych związków w strukturach gleby. W rutynowych badaniach sorpcyjnych jakichkolwiek zanieczyszczeń zwykle nie prowadzi się tego typu eksperymentów, a jak wynika z uzyskanych danych ma to istotny wpływ na intensywność i odwracalność sorpcji. Jako modelową substancję – mając na uwadze wcześniej omówione wyniki badań – wybrano metoprolol. Spodziewano się bowiem, że związek ten będzie wykazywał znacznie mniejszą mobilność w warunkach testu dynamicznego niż omawiane leki przeciwnowotworowe. Dodatkowo forma kationowa, w jakiej występować będzie w warunkach

eksperymentu, może sprzyjać dodatkowym oddziaływaniom z lekami przeciwnowotworowymi, prowadząc do ich odmiennego zachowania w środowisku glebowym. Biorąc pod uwagę wyznaczone wartości stężeń kumulatywnych (**Rysunek A.1 i A.2**, [H5]) w poszczególnych frakcjach, potwierdzono, że metoprolol charakteryzuje się nie tylko znacznie mniejszą mobilnością niż dwa wybrane leki przeciwnowotworowe, ale przede wszystkim znacząco obniża mobilność IF (o 29 % dla gleby MS i o 26 % dla gleby LS) i CK (o 21 % dla gleby LS, ale nieznacząco dla gleby MS) w środowisku glebowym.

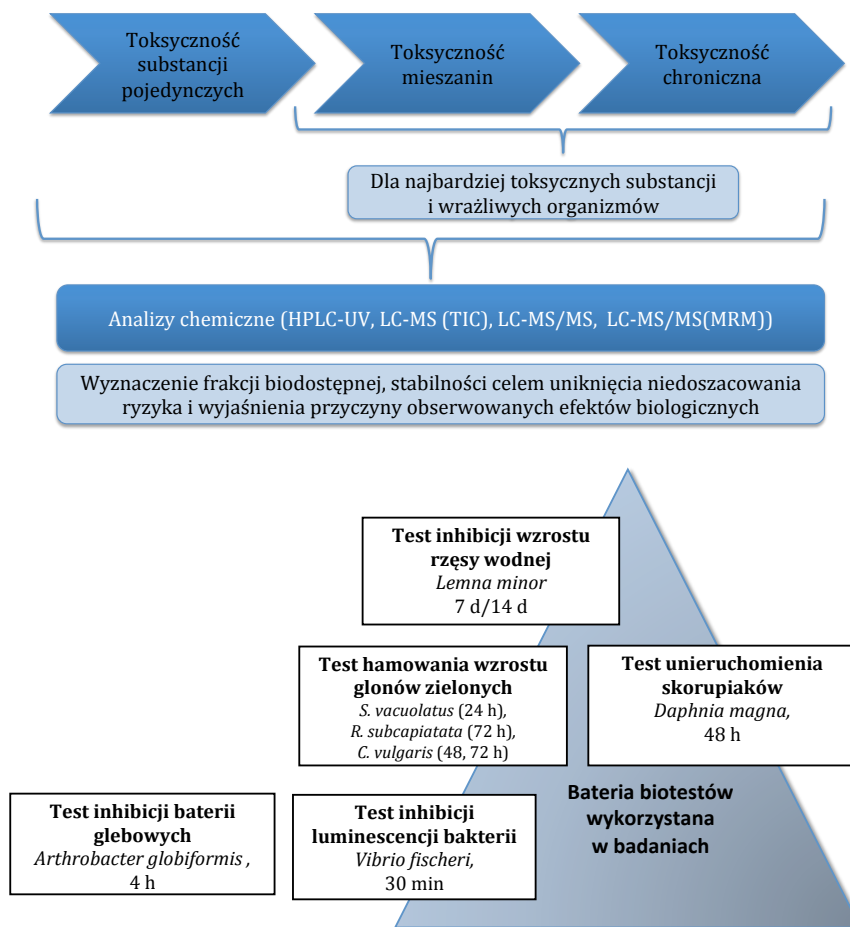
Biorąc pod uwagę wyznaczone dodatkowe parametry fizykochemiczne zbieranych frakcji (tj. pH, przewodność, mętność, zawartość całkowitego węgla organicznego) (**Tabela B.1**, [H5]) w trakcie testu dynamicznego można domniemać, iż wybrane do badań leki przeciwnowotworowe w warunkach prowadzonego eksperymentu obecne są w formie anionów na skutek odszczepienia protonu przy grupie fosfoamidowej, które to wykazują większe powinowactwo do dodatnio naładowanych cząsteczek metoprololu zaadsorbowanych na ujemnie naładowanej powierzchni gleby. Możliwość zajścia sorpcji wielowarstwowej jest zgodna z wcześniej poczynionymi obserwacjami w ramach badań potencjału sorpcyjnego BB w teście statycznym [H4]. Ponadto, biorąc pod uwagę zaobserwowaną odwrotnie proporcjonalną zależność przewodności od mętności zbieranych frakcji nie można także wykluczyć transportu CK i IF na cząstkach stałych gleby, mimo obserwowanej zmniejszonej mobilności w obecności metoprololu. Jest to zgodne z wynikami testu statycznego jaki przeprowadzono dla tych związków. (**Rysunek B.1**, [H5]). W przypadku testów bez obecności współzanieczyszczenia stężenia badanych leków przeciwnowotworowych były niższe w teście statycznym niż dynamicznym. Może być to wynikiem dodatkowego ładunku eluowanych z kolumny związków wnoszonego wraz z wymywaną frakcją zawieszoną, podczas gdy w teście statycznym, frakcja ta jest całkowicie odwirowana.

Uzyskane wyniki badań nad oceną mobilności różnych strukturalnie BB, jak i przedstawicieli leków przeciwnowotworowych wskazują, iż obie grupy farmaceutyków po przedostaniu do środowiska niosą ze sobą wysokie ryzyko mobilności prowadzącej do ich przenikania zarówno do wód powierzchniowych oraz podpowierzchniowych.

Mając na uwadze dotychczas omówione wyniki badań oraz wcześniej wspomniane problemy związane z obecnie obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi oceny ryzyka środowiskowego leków, przeprowadzone zostały dogłębne badania ekotoksykologiczne, których schemat przedstawiono na **Rysunku 4**. Obejmowały one w pierwszej kolejności wyznaczenie dotąd nie poznanej toksyczności wielu leków (jako substancji pojedynczych) i ich wybranych

produktów transformacji z wykorzystaniem baterii biotestów opartej o organizmy reprezentujące różne poziomy organizacji biologicznej [H6-H10].

Następnie dla najbardziej toksycznych substancji oraz najbardziej wrażliwych organizmów dokonano oceny toksyczności mieszanin [H10-H11], jak i toksyczności chronicznej [H12]. W badaniach tych zastosowano techniki chromatografii cieczowej z różnymi systemami detekcji (**Rysunek 4**), co umożliwiło zarówno wyznaczenie frakcji biodostępnej badanych substancji dla poszczególnych organizmów, jak i określenie ich stabilności w warunkach prowadzonych biotestów. Miało to na celu uniknięcie niedoszacowania ryzyka oraz wyjaśnienie potencjalnych przyczyn obserwowanych efektów biologicznych. **Takie holistyczne podejście (uwzględniające zastosowanie technik analitycznych w testach ekotoksykologicznych) dalece bardziej uwiarygadnia obserwacje biologiczne. Podejście to odbiega znacząco od dotychczasowych rutynowo prowadzonych w tym obszarze na całym Świecie. Tym bardziej należy żywić nadzieję, że stanie się ono standardem metodycznym ekotoksykologii „nowopojawiających” się zanieczyszczeń środowiska, biorąc pod uwagę uzyskane i przedstawione w tym osiągnięciu wyniki badań.**



Rysunek 4. Schemat przeprowadzonych badań ekotoksykologicznych

W poniższych tabelach (**Tabela 2a oraz 2b**) przedstawiono zbiorczo wszystkie dane ekotoksykologiczne uzyskane w toku badań, które opublikowane zostały w pracach [H6-H12]. Wszystkie testy przeprowadzone zostały zgodnie z wytycznymi OECD czy DIN, co zostało szczegółowo opisane w pracach [H6-H11]. Na podstawie wyznaczonych wartości parametru EC_{50} (o ile było to możliwe w badanym zakresie stężeń) dokonano klasyfikacji pod względem toksyczności wobec organizmów wodnych zgodnie z Dyrektywą UE 93/67/EEC [21] każdej z badanej substancji (pojedynczych leków oraz wybranych produktów transformacji). Należy dodać, iż najwyższe stężenia analitów w poszczególnych testach ekotoksykologicznych uwarunkowane były rozpuszczalnością danej substancji w wodzie i odpowiedniej pożywce biologicznej. Najwyższym testowanym stężeniem danego związku chemicznego (o ile były to związki dobrze rozpuszczalne w wodzie oraz pożywce biologicznej) było 100 mg/l (za wyjątkiem trimetoprimu i oceny wpływu zasolenia na jego toksyczność [H9]), bowiem zgodnie z wyżej wymienioną Dyrektywą substancje, dla których wartość parametru EC_{50} jest wyższa niż 100 mg/l uznaje się za nietoksyczne. Wśród badanych leków uwzględniono także wybrane produkty transformacji, tj. 7-hydroksymetotreksat (metabolit i produkt biodegradacji metotreksatu – leku przeciwnowotworowego) [H8] oraz sulfanilamid i kwas sulfanilowy (najczęściej wykrywane produkty transformacji sulfonamidów – leków o działania przeciwbakteryjnym powszechnie stosowanych w weterynarii, ale także i medycynie) [H10]. Natomiast jako organizmy testowe wybrano takie, które są z jednej strony powszechnie spotykane w środowisku i już rutynowo wykorzystywane w badaniach ekotoksykologicznych, ale jednocześnie reprezentujące różne poziomy organizacji biologicznej, tak aby w możliwie jak najszerszym stopniu ocenić potencjalny wpływ tych substancji na funkcjonowanie ekosystemu.

Tabela 2a. Zestawienie wyników z przeprowadzonych badań ekotoksykologicznych

Organizm testowy/ Nazwa substancji	GLONY ZIELONE			ROŚLINY <i>L. minor</i> (7 d)	SKORUPIAKI <i>D. magna</i> (48 h)	BAKTERIE GLEBOWE <i>A. globiformis</i> (4 h)
	BAKTERIE MORSKIE <i>V. fischeri</i> (30 min)	<i>S. vacuolatus</i> (24 h)* <i>R. subcapitata</i> (72 h)** <i>C. vulgaris</i> (48, 72 h)***				
propranolol ^[H6]	> 100	24*	> 100	n. w.	> 100 / 218 (w/ bez obecności gleby)	
metoprolol ^[H6]	> 100	75*	> 100	n. w.	> 100	
nadolol ^[H6]	> 100	100*	> 100	n. w.	> 100	
fenbendazol ^[H7]	> 0,3	> 1*	> 1	0,019	n. w.	
flubendazol ^[H7]	> 0,3	> 1*	> 1	0,045	n. w.	
5-fluorouracyl ^[H8]	> 100	0,075**	2,45	> 100	n. w.	
cyklofosfamid ^[H8]	> 100	> 100**	> 100	> 100	n. w.	
ifosfamid ^[H8]	> 100	> 100**	> 100	> 100	n. w.	
imatynib ^[H8]	23,06	5,08**	61,05	72,43	n. w.	
tamoksyfen ^[H8]	> 0,2	> 0,2**	0,18 – 0,23 (w zależności od warunków prowadzonego testu)	> 0,2	n. w.	
metotreksat ^[H8]	> 100	9,51**	0,08 – 0,16 (w zależności od warunków prowadzonego testu)	> 100	n. w.	
7-hydroksy-metotreksat ^[H8]	> 10	> 10**	8,3	n. w.	n. w.	

n. w. – nie wyznaczono

Klasyfikacja toksyczności wobec organizmów wodnych wg. Dyrektywy UE 93/67/EEC [21]:

< 0,1 mg/l Niezwykłe toksyczny	10 – 100 mg/l Szkodliwy
0,1 – 1 mg/l Bardzo toksyczny	> 100 mg/l Nietoksyczny
1 – 10 mg/l Toksyczny	

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, iż najbardziej czułym organizmem jest rzęsa wodna (*L. minor*), a następnie glony zielone. Część leków została sklasyfikowana jako niezwykle toksyczna wobec organizmów wodnych, tak jak 5-fluorouracyl, fenbendazol, flubendazol i metotreksat oraz bardzo toksyczne jak tamoksyfen. Udowodniono także, że toksyczność metabolitu metotreksatu jest mniejsza niż formy natywnej. Spośród przetestowanych organizmów za najmniej wrażliwe uznać należy bakterie luminescencyjne *V. fischeri*, co może wynikać z faktu, iż testy z ich użyciem trwają bardzo krótko (30 min). W przypadku testu z wykorzystaniem rzęsy wodnej (*L. minor*), który trwa 7 dni, czas ekspozycji

wyduje się dostatecznie długi do zaobserwowania określonych efektów biologicznych na wybrane leki. Jeśli dla przykładu weźmie się pod uwagę wytypowane do badań leki cytostatyczne (za wyjątkiem CK i IF), które prowadzą do inhibicji syntezy DNA w komórce na drodze różnych mechanizmów, a w czasie tego testu dochodzi do intensywnego podziału materiału genetycznego, to ich mechanizm toksycznego działania wobec wytypowanego gatunku roślin może wynikać z ich farmakologicznego mechanizmu działania (ang. *Mode of Action*, MoA) [H8]. Natomiast zarówno CK i IF okazały się być nietoksyczne wobec wszystkich z testowanych organizmów, co przede wszystkim może wynikać z faktu, iż leki te aktywowane są dopiero w organizmie człowieka i to ich metabolity wykazują aktywność biologiczną, a nie formy natywne [H8]. Biorąc tym samym pod uwagę wcześniej wykazany wysoki potencjał do przenikania tych cytostatyków do zbiorników wodnych [H5], a także udowodnioną niską toksyczność [H8], można sądzić, iż ryzyko środowiskowe dla tych substancji jest niewielkie.

Podobnie, stosunkowo niskim zagrożeniem dla organizmów wodnych charakteryzują się pozostałości beta-blokerów [Tabela 2, H6]. Zaobserwowano jedynie, że wraz ze wzrostem ich hydrofobowości wzrasta ich toksyczność wobec glonów zielonych (*S. vacuolatus*). Co ciekawe, wykazano, że toksyczność propranololu wobec bakterii glebowych *A. globiformis* była wyższa w teście bez gleby niż z glebą (Rysunek 3S, [H6]), co potwierdza fakt, iż sorpcja tych związków do struktur glebowych prowadzi do obniżenia frakcji biodostępnej dla danego organizmu.

Na uwagę zasługuje fakt, iż spośród przetestowanych leków jedynie imatynib o działaniu przeciwnowotworowym [H8] wykazywał różnorodną toksyczność wobec wszystkich wziętych pod uwagę organizmów testowych. Wynikać to może także z jego specyficznego MoA, który polega na inhibicji kinaz tyrozynowych. Te zaś są kluczowym elementem systemu przekazywania informacji we wszystkich komórkach i stanowią niezbędne ogniwo odpowiedzialne za kontakt i komunikację ze środowiskiem zewnętrznym.

Udowodniono także niezwykle toksyczne działanie dwóch leków o działaniu przeciwpasożytniczym: fenbendazolu (FEN) i flubendazolu (FLU) wobec rozwielitki *D. magna* [Tabela 3, H7]. Biorąc pod uwagę wyznaczone wartości parametrów stężeń skutecznych wynoszące odpowiednio $EC_{50, FLU} = 0,045$ mg/l, $EC_{50, FEN} = 0,019$ mg/l, jak i ich wartości współczynników $\log P_{FLU} = 2,91$ oraz $\log P_{FEN} = 3,93$ zaistniało podejrzenie, iż ich toksyczność może wynikać z ich hydrofobowego charakteru. Przeprowadzono dodatkowe obliczenia z użyciem dostępnych modeli pozwalających na przewidywanie mechanizmu działania substancji zwanych jako „baseline toxicants”. Na ich podstawie wykazano jednak, że obserwowany efekt biologiczny wobec *D. magna* wynika z ich specyficznego mechanizmu

działania. Biorąc pod uwagę fakt, iż ich MoA polega na wiązaniu się tych leków do beta-tubulin i inhibicji tworzenia się mikrotubuli w komórkach, które to obecne są zarówno w komórkach zwierzęcych, roślinnych jak i bakteryjnych – niemożliwe jest na chwilę obecną jednoznaczne wskazanie przyczyn obserwowanej silnej toksyczności tych dwóch leków.

W toku dalszych prac (wyniki tych badań zestawiono w **Tabeli 2b**) postanowiono dokonać oceny toksyczności dwóch najczęściej identyfikowanych produktów transformacji sulfonamidów (SAs), wskazując tym samym, że tylko jeden z nich (sulfanilamid, SN) wykazuje pewną aktywność biologiczną, aczkolwiek niższą niż formy natywne leków [H10]. Główną przesłanką pojętych badań nad charakterystyką toksyczności produktów degradacji sulfonamidów [H10], a także i oceną efektów biologicznych ich mieszanin [H10] oraz skutków długofalowych [H12], były uzyskane w ramach realizacji pracy doktorskiej podstawowe badania odnoszące się do oceny toksyczności dwunastu sulfonamidów (jako substancji pojedynczych) wobec różnorodnych organizmów [22]. Udowodniono wówczas, że leki te wykazują silnie działania fitotoksyczne wobec *L. minor* oraz toksyczne wobec glonów zielonych (*S. vacuolatus*), co także zostało przedstawione w **Tabeli 2b**. Z tych też względów badania te postanowiono kontynuować i znacząco rozszerzyć, co zostało m. in. zrealizowane podczas odbytego przeze mnie ośmiomiesięcznego stażu podoktorskiego w Centrum Badań Środowiska i Zrównoważonych Technologii (UFT) Uniwersytetu w Bremie w Niemczech.

Tabela 2b. Zestawienie wyników z przeprowadzonych badań ekotoksykologicznych c.d. (klasyfikacja kolorystyczna jak w Tabeli 2a)

Organizm testowy/ Nazwa substancji	BAKTERIE MORSKIE <i>V. fischeri</i> (30 min)	GLONY ZIELONE <i>S. vacuolatus</i> (24 h)* <i>R. subcapitata</i> (72 h)** <i>C. vulgaris</i> (48, 72 h)***	ROŚLINY <i>L. minor</i> (7 d)	SKORUPIAKI <i>D. magna</i> (48 h)	BAKTERIE GLEBOWE <i>A. globiformis</i> (4 h)
12 sulfonamidów ^[22]	> 20	2,22 – 32,25*	0,02 – 4,89	n. w.	> 80
sulfanilamid ^[H10]	n. w.	25,83*	5,09	n. w.	n. w.
kwask sulfanilowy ^[H10]	n. w.	> 100*	> 100	n. w.	n. w.
Wpływ zasolenia na toksyczność^[H8]					
sulfametoksazol		[48 h]: 0,98 – 9,31*** [72 h]: 0,95 – 1,53*** (w zależności od zasolenia)			
sulfadimetoksyna		[48 h]: 4,94 – 26,65*** [72 h]: 1,02 – 7,65*** (w zależności od zasolenia)			
sulfapirydyna		[48 h]: 1,79 – 3,20*** [72 h]: 0,28 – 1,81*** (w zależności od zasolenia)			
trimetoprim		[48 h]: 123 – n. w.*** [72 h]: 90 – n. w.*** (w zależności od zasolenia)			
Toksyczność mieszanin^[H10, H11]		Toksyczność mieszaniny 6SAs oraz 6SAs+SN wobec <i>S. vacuolatus</i> i <i>L. minor</i> ^[H10]		Toksyczność mieszaniny FEN + FLU wobec <i>D. magna</i> ^[H11]	
Toksyczność chroniczna^[H12]			Toksyczność 5SAs wobec <i>L. minor</i> w teście przedłużonym, 14 d		

n. w. – nie wyznaczono

W ramach tych badań postanowiono także po raz pierwszy dokonać oceny wpływu zasolenia na toksyczność trzech najczęściej wykrywanych sulfonamidów (sulfametoksazol, sulfapirydyna, sulfadimetoksyna) i trimetoprimu w próbkach wód morskich pobranych ze strefy przybrzeżnej południowego Bałtyku [H9] (mając na uwadze uzyskane wyniki opisane w pracach [H1-H2]). Jako przedstawiciela organizmów bytujących w środowisku morskim, w tym powszechnie występującym w Morzu Bałtyckim, wybrano glony zielone – *Chlorella vulgaris* (gatunek glonów kosmopolityczny, występujący nie tylko w wodach morskich, ale także słodkowodnych oraz estuariowych), spodziewając się równocześnie znaczącego wpływu toksycznego sulfonamidów na te organizmy. Dane literaturowe dla tego gatunku glonów były ograniczone i dostępne tylko dla sulfadimetoksyny oraz sulfametoksazolu. Toksyczność tych

leków oceniana była przy zasoleniu w zakresie od 0 do 9 PSU (0, 3, 6 i 9 PSU), odzwierciedlającym zakres zasolenia wód Morza Bałtyckiego [H9], po czasie 48 h oraz 72 h. Na podstawie wyznaczonych wartości parametru EC_{50} po czasie 48 h oraz 72 h, jak i zależności od zasolenia (**Tabela 4**, [H9]) oraz przeprowadzonej analizy statystycznej uzyskanych danych, udowodniono, że: *i*) SAs wykazują toksyczne działania także wobec *C. vulgaris* niezależnie od zastosowanego zasolenia; *ii*) trimetoprim jest związkiem nietoksycznym wobec *C. vulgaris*, a jego toksyczność wraz ze wzrostem zasolenia maleje; *iii*) w większości przypadków najniższa toksyczność SAs obserwowana była przy najwyższym zasoleniu (9 PSU), za wyjątkiem sulfadimetoksyny (72 h), która najmniej toksyczna była w wodzie niezasolonej (0 PSU); *iv*) wzrost czasu ekspozycji tych organizmów na obecność badanych leków prowadził, w większości przypadków, do wzrostu toksyczności, szczególnie w środowisku o najwyższym zasoleniu. Biorąc pod uwagę uzyskane w toku tych badań wyniki analiz chemicznych wykazano, że badane leki są stabilne w warunkach prowadzonych testów toksykologicznych, a także są bardzo dobrze rozpuszczalne w zastosowanych pożywkach. Obserwowane efekty biologiczne wynikały zatem z działania formy natywnej badanych leków a nie ze zmniejszającego się stężenia frakcji biodostępnej (łatwo przyswajalnej) dla organizmów leków wraz ze wzrostem zasolenia, czy też powstaniem bardziej toksycznych produktów degradacji. Biorąc pod uwagę ich właściwości kwasowo-zasadowe, a co za tym idzie potwierdzoną obecność tych leków w warunkach prowadzonego testu w formie obojętnej (trimetoprim ok. 90 %, sulfapirydyna ok. 85 %) lub anionu (sulfametoksazol ok. 95 %, sulfadimetoksyna ok. 84 %) potencjalne oddziaływanie analitów obecnych w formie kationu z anionami chlorkowymi obecnymi w największej ilości w wodach morskich, prowadzącymi do ich zmniejszonej biodostępności – jest także niemożliwe. Ponadto, podobnie jak dla FEN i FLU, stosując odpowiednie modele przewidywania mechanizmu toksyczności substancji chemicznych wobec *C. vulgaris* (co szczegółowo opisano w **Rozdziale 2.6** oraz **3.4** [H9]) wykazano, że mechanizm toksycznego działania tych leków ma charakter specyficzny, a zatem nie wiąże się wyłącznie z ich hydrofobowością i zdolnością do pokonywania barier biologicznych.

Jak już wspomniano, przeprowadzone zostały analizy chemiczne próbek (roztworów analitów w danej pożywce testowej) przed oraz na zakończenie testu ekotoksykologicznego. Miało to na celu wyznaczenie frakcji biodostępnej analitów oraz określenie ich stabilności w warunkach prowadzonego testu. Uzyskane wyniki badań zaprezentowane w pracach [H6-H12] (zebrane zbiorczo w **Tabeli 3**) pozwoliły na stwierdzenie, iż zastosowane w testach ekotoksykologicznych stężenia nominalne analitów były bliskie stężeniom rzeczywistym

(różnica zgodnie z zaleceniami OECD mieściła się w zakresie 80 – 100 %, co zostało oznaczone kolorem zielonym), a zatem frakcji biodostępnej dla organizmów. Wyznaczona toksyczność przebadanych substancji została zatem poprawnie oszacowana, za wyjątkiem tamoksyfenu, dla którego ze względu na jego niską rozpuszczalność w wodzie, można mówić o pewnym niedoszacowaniu ryzyka.

Tabela 3. Wyznaczona zawartość frakcji biodostępnej dla najwyższego stężenia danego analitu w warunkach prowadzonych testów ekotoksykologicznych

Organizm testowy/ Nazwa substancji	BAKTERIE	GLONY ZIELONE	ROŚLINY	SKORUPIAKI
	<i>V. fischeri</i> (30 min)	<i>S. vacuolatus</i> (24 h)*/ <i>R. subcapitata</i> (72 h)**/ <i>C. vulgaris</i> (48, 72 h)***	<i>L. minor</i> (7 d)	<i>D. magna</i> (48 h)
propranolol ^[H6]	102,6	100,8*	101,9	
metoprolol ^[H6]	100,5	102,9*	102,8	
nadolol ^[H6]	102,4	100,2*	99,5	
fenbendazol ^[H7]	83,0	74,4*	75,0	95,6
flubendazol ^[H7]	96,1	78,2*	75,7	98,4
5-fluorouracyl ^[H8]	105,5	103,8**	98,5	100,3
cyklofosfamid ^[H8]	101,2	98,2**	99,7	97,2
ifosfamid ^[H8]	99,8	100,3**	104,5	98,7
imatynib ^[H8]	97,0	104,3**	96,9	88,4
tamoksyfen ^[H8]	47,9	53,5**	38,6	56,8
metotreksat ^[H8]	89,2	98,9**	112,9	90,2
7-hydroksymetotreksat ^[H8]	93,9	97,6**	94,9	86,4
sulfanilamid ^[H10]		> 80*	> 80	
kwas sulfanilowy ^[H10]		> 80*	> 80	
Wpływ zasolenia na toksyczność^[H9]				
sulfametoksazol		99,4 – 101,8*** (w zależności od zasolenia)		
sulfadimetoksyna		97,2 – 99,2*** (w zależności od zasolenia)		
sulfapirydyna		98,2 – 100,4*** (w zależności od zasolenia)		
trimetoprim		98,9 – 99,5*** (w zależności od zasolenia)		
Toksyczność mieszanin^[H10,H11]				
6SAs		> 80*	> 80	
6SAs + SN		> 80*	> 80	
FEN + FLU				> 95
Toksyczność chroniczna, 14 d^[H12]				
5SAs			87,7 – 107,9	

> 80 %

50 – 80 %

< 50 %

nie dotyczy

Wyniki badań nad oceną stabilności (Tabela 4) badanych substancji w warunkach prowadzonych testów udowodniły, iż w większości przypadków (dla których stabilność wynosiła > 80 %, kolor zielony) obserwowany efekt biologiczny wynikał głównie z obecności formy natywnej tych substancji. Wyjątek stanowiły metotreksat (MET), 7-hydroksymetotrksat (7-OH-MET) oraz tamoksifen (TAM), dla których w ogóle nie zaobserwowano formy natywnej na zakończenie testu, a zatem ich toksyczność mogła wynikać z potencjalnie powstających w warunkach prowadzonego eksperymentu produktów degradacji.

Tabela 4. Wyznaczona stabilność danego analitu w warunkach prowadzonych testów ekotoksykologicznych

Organizm testowy/ Nazwa substancji	BAKTERIE	GLONY ZIELONE	ROŚLINY	SKORUPIAKI
	<i>V. fischeri</i> (30 min)	<i>S. vacuolatus</i> (24 h)*/ <i>R. subcapitata</i> (72 h)**/ <i>C. vulgaris</i> (48, 72 h)***	<i>L. minor</i> (7 d)	<i>D. magna</i> (48 h)
propranolol ^[H6]	n. w.	n. w.	n. w.	
metoprolol ^[H6]	n. w.	n. w.	n. w.	
nadolol ^[H6]	n. w.	n. w.	n. w.	
fenbendazol ^[H7]	n. w.	n. w.	n. w.	> 80
flubendazol ^[H7]	n. w.	n. w.	n. w.	> 80
5-fluorouracyl ^[H8]	n. w.	75,9**	83,2	100,2
cyklofosfamid ^[H8]	n. w.	96,6**	85,0	99,2
ifosfamid ^[H8]	n. w.	97,2**	98,0	98,1
imatynib ^[H8]	n. w.	80,9**	107,3	90,0
tamoksyfen ^[H8]	n. w.	n. w. **	0	0
metotreksat ^[H8]	n. w.	0**	0	n. w.
7-hydroksymetotrksat ^[H8]	n. w.	0**	0	n. w.
sulfanilamid ^[H10]		> 80*	> 80	
kwas sulfanilowy ^[H10]		> 80*	> 80	
Wpływ zasolenia na toksyczność^[H9]				
sulfametoksazol		98,0 – 100,7*** (w zależności od zasolenia)		
sulfadimetoksyna		100,9 – 102,3*** (w zależności od zasolenia)		
sulfapirydyna		99,1 – 101,8*** (w zależności od zasolenia)		
trimetoprim		100,2 – 101,2*** (w zależności od zasolenia)		
Toksyczność mieszanin^[H10,H11]				
6SAs ^[H10]		> 80	> 80	
6SAs + SN ^[H10]		> 80	> 80	
FEN + FLU ^[H11]				77 – 92
Toksyczność chroniczna, 14 d^[H12]			0 – 94,9	
5SAs				

> 80 %

50 – 80 %

< 50 %

nie dotyczy

Ponieważ część wybranych do badań leków charakteryzowała się stosunkowo wysokimi wartościami współczynnika logP (szczególnie TAM, a także FEN i FLU) zachodziło podejrzenie, że w warunkach prowadzonych eksperymentów ekotoksykologicznych z użyciem polipropylenowych naczyń testowych, obserwowany ubytek leku mógł wynikać również z ich adsorpcji na powierzchni tych naczyń. W związku z tym przeprowadzono dodatkowe analizy chemiczne z użyciem zarówno naczyń szklanych i polipropylenowych. Stwierdzono, że zarówno w przypadku FEN i FLU w teście z wykorzystaniem *D. magna* [H7] ubytek tych leków w naczyniu polipropylenowym nie przekraczał 20 % (**Rysunek 1**, [H7]), a zatem uznany mógł być za nieznaczący. Podobne obserwacje poczyniono dla MET i jego metabolitu (7-OH-MET) oraz TAM w warunkach testu z wykorzystaniem rzęsy wodnej (*L. minor*) (**Rysunek 2A**, [H8]). Pod uwagę wzięto także możliwość ulegania biosorpcji czy bioakumulacji tych substancji na powierzchni/do badanych organizmów. Jednak przeprowadzone w tym zakresie badania dla FEN i FLU wobec rozwielitki (w warunkach testu w obecności organizmów jak i bez) nie wykazały żadnych istotnych statystycznie różnic pomiędzy tymi próbami [**Rysunek 2**, [H11]]. Z kolei w przypadku 7-OH-MET oraz TAM (**Rysunek 2A**, [H8]), wyniki badań wskazują, że ich biosorpcja/bioakumulacja do materiału roślinnego (*L. minor*) nie może być całkowicie wykluczona.

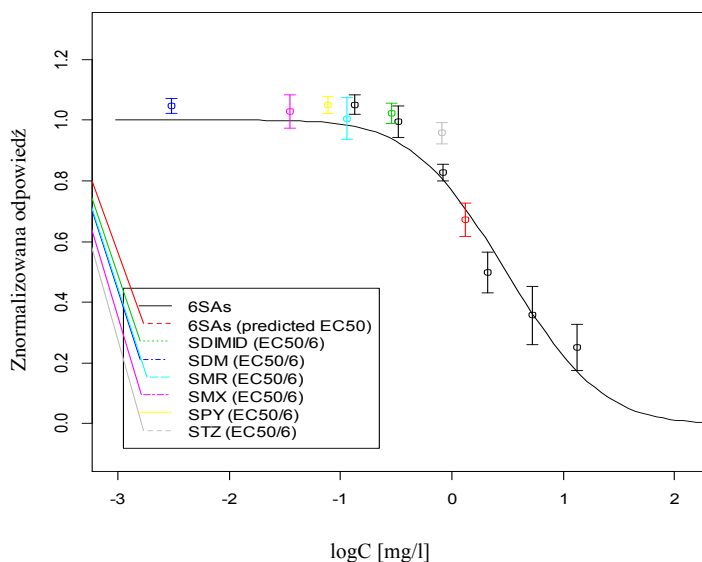
Pod uwagę wzięto także możliwość fotodegradacji badanych związków w warunkach testu z rzęsą wodną, bowiem prowadzony jest on przy ciągłym naświetlaniu (6 klx) przez 7 dni. Uzyskane w toku badań wyniki (**Rysunek 2**, [H8]) potwierdziły, iż w przypadku wszystkich trzech analitów dochodzi do stopniowej fotodegradacji tych związków. Z tych też względów, dla TAM i MET przeprowadzone zostały rozszerzone badania ekotoksykologiczne (**Rysunek 1A**, [H8]) w tak zwanych warunkach semi-statycznych, czyli z wymianą roztworu analitu w medium w czasie trwania eksperymentu. Na podstawie uzyskanych wyników (**Tabela 4**, [H8]) stwierdzono, że toksyczność MET wzrastała wraz z częstotliwością wymiany medium, czyli wraz ze wzrostem częstotliwości dostarczania świeżej porcji formy natywnej: $EC_{50, \text{wymiana codziennie}} = 0,08 \text{ mg/l}$, $EC_{50, \text{wymiana w 3 i 5 dzień}} = 0,11 \text{ mg/l}$, $EC_{50, \text{bez wymiany}} = 0,16 \text{ mg/l}$. Natomiast toksyczność TAM utrzymywała się ona na podobnym poziomie: $EC_{50, \text{wymiana codziennie}} = 0,23 \text{ mg/l}$, $EC_{50, \text{wymiana w 3 i 5 dzień}} = 0,22 \text{ mg/l}$, $EC_{50, \text{bez wymiany}} = 0,18 \text{ mg/l}$. Wykazano tym samym, że powstające produkty degradacji MET są mniej toksyczne, w przeciwieństwie do produktów TAM, które wykazują najprawdopodobniej podobną toksyczność co forma natywna. Wykorzystując technikę LC-MS/MS podjęto się także próbę identyfikacji powstających

produktów degradacji, potwierdzając dla przykładu tym samym obecność dwóch najczęściej identyfikowanych produktów fotodegradacji TAM o $m/z = 370$ [H8].

Mając na uwadze na uzyskane wyniki badań dla najbardziej toksycznych substancji oraz najbardziej wrażliwych organizmów postanowiono dokonać oceny toksyczności mieszanin. Ponieważ możliwość kombinacji jest nieskończenie wielka, jako modelowe układy wytypowano mieszaniny fenbendazolu i flubendazolu wobec *D. magna* [H11], a także sześciu sulfonamidów (6SAs) wraz z ich produktem transformacji (6SAs+SN) wobec nie tylko rzęsy wodnej *L. minor*, ale i glonów zielonych *S. vacuolatus* [H10]. Do badań wytypowano: sulfatiazol, sulfamerazyne, sulfadimidynę, sulfametoksazol, sulfadimetoksynę oraz sulfapirydynę, jako substancje o szerokim spektrum toksyczności wobec testowanych organizmów [22], jak i często wykrywanych w próbkach środowiskowych. W badaniach tych uwzględniono zastosowanie dwóch rekomendowanych w literaturze przedmiotu modeli do przewidywania toksyczności mieszanin różnorodnych substancji: model addytywności (ang. *Concentration Addition*, CA) oraz model niezależnego działania (ang. *Independent Action*, IA). Zgodnie z podstawowymi założeniami modelu CA, substancje w mieszaninie mają podobny mechanizm działania, różnią się tylko siłą, zaś każda substancja wpływa na toksyczność całej mieszaniny proporcjonalnie do dawki. Ponadto, co jest niezmiernie istotne, substancje w mieszaninie w stężeniach mniejszych lub równych ich NOECs (ang. *No – Observed Effect Concentration* – stężenie niewywołujące efektu toksycznego) mogą wywierać efekt toksyczny. Model IA zakłada natomiast, że substancje w mieszaninie działają niezależnie i charakteryzują się odmiennym mechanizmem działania, a występując razem w stężeniach mniejszych lub równych ich NOECs nie będą wywierać efektu toksycznego. W badaniach toksyczności mieszanin sugeruje się zastosowanie modelu CA jako domyślnego i najbardziej bezpiecznego do przewidywania toksyczności danych mieszanin, co też zostało uwzględnione w pracach [H10-H11].

Schemat przeprowadzonych badań oceny toksyczności mieszanin FEN i FLU przedstawiono na **Rysunku S1** w [H11], natomiast dla sześciu sulfonamidów (6SAs) oraz sześciu sulfonamidów i sulfanilamidu (6SAs+SN) na **Rysunku A1** w [H10]. W efekcie porównano przewidywane wartości parametru EC_{50} (lub przewidywanego efektu biologicznego [%]), obliczone zgodnie z omawianymi modelami (opisanymi m. in. w **Rozdziale 2.5**, [H11]) oraz wyznaczone eksperymentalnie wartości tego parametru (**Tabela 3** [H11] oraz **Tabela 4** [H10]). Na tej podstawie udowodniono, że model addytywności, jest modelem wystarczająco bezpiecznym do przewidywania toksyczności mieszanin leków o tym samym mechanizmie działania zarówno dla mieszaniny dwóch benzimidazoli [H11], jak i sulfonamidów wraz z ich

produktem transformacji [H10]. Dla przykładu, słuszność zastosowania tego modelu potwierdzają dane zaprezentowane na poniższym wykresie (**Rysunek 5**), gdzie pojedyncze sulfonamidy w danym stężeniu nie wywołują efektu toksycznego, zaś zmieszane ze sobą dokładnie w takich dawkach ten efekt toksyczny wykazują (choć mniejszy niż przewidywany zgodnie z modelem CA).



Rysunek 5. Wyznaczona toksyczność sulfonamidów jako substancji pojedynczych w stężeniu równym ich 1/6 wartości EC_{50} (niewywołującym znacznego efektu biologicznego – odpowiedź bliska 1) oraz ich mieszanie w dokładnie takich samych dawkach (wywołującej efekt toksyczny – oznaczony kolorem czerwonym)

Badania te stanowią istotny wkład w stan wiedzy na temat zagrożeń jakie mogą nieść pozostałości tych leków w środowisku. Udowodniają one równocześnie, iż toksyczność mieszanin leków w środowisku nie powinna być ignorowana, ponieważ nawet gdy dane leki obecne są w środowisku w stężeniach niewywołujących efektu toksycznego, to w mieszaninie ten efekt biologiczny mogą wywołać. Uzasadnia to obawy wielu naukowców co do adekwatności obecnie obowiązujących wytycznych ERA farmaceutyków, które nie biorą pod uwagę oceny toksyczności mieszanin.

Ostatecznie, po raz pierwszy dokonano także oceny toksyczności chronicznej wybranych sulfonamidów w warunkach przedłużonego testu z wykorzystaniem rzęsy wodnej jako najbardziej wrażliwego organizmu na tę grupę leków [H12]. Do badań wybrano pięć substancji należących do tej grupy: sulfadimetoksynę (SDM), sulfametoksazol (SMX), sulfamerazynę (SMR), sulfadimidinę (SDIMID) oraz sulfatiazol (STZ) [H12]. Eksperymenty polegały na: i) ocenie toksyczności pięciu wybranych SAs w teście przedłużonym (czas trwania testu wynosił 14 dni) z wykorzystaniem rzęsy wodnej *L. minor*, którą porównano z tą wyznaczoną

w warunkach standardowych (test trwający 7 dni); *ii*) ocenie toksyczności roztworów sulfonamidów (na 3 wybranych poziomach stężeń, **Tabela 1** [H12]) po naświetlaniu; *iii*) przeprowadzeniu szeregu analiz chemicznych z wykorzystaniem techniki HPLC-UV (do analiz ilościowych), jak i LC-MS/MS w trybie MRM (do analizy jakościowej) w celu określenia stopnia eliminacji formy natywnej leku w czasie trwania eksperymentu jak i do potwierdzenia obecności formy natywnej leku w próbce oraz dwóch najczęściej wykrywanych produktów fotodegradacji sulfonamidów – kwasu sulfanilowego oraz sulfanilamidu.

Na tej podstawie stwierdzono, że szereg toksyczności ostrej różni się od toksyczności chronicznej (**Rysunek 3**, [H12]). Dla dwóch z testowanych sulfonamidów – najbardziej toksycznych w teście standardowym (SDM i SMX) zaobserwowano spadek toksyczności (dla SDM: $EC_{50, 7 \text{ dni}} = 0,02 \text{ mg/l}$ vs. $EC_{50, 14 \text{ dni}} = 0,15 \text{ mg/l}$; dla SMX: $EC_{50, 7 \text{ dni}} = 0,21 \text{ mg/l}$ vs. $EC_{50, 14 \text{ dni}} = 1,90 \text{ mg/l}$), a dla pozostałych wzrost w teście przedłużonym (dla SMR: $EC_{50, 7 \text{ dni}} = 0,68 \text{ mg/l}$ vs. $EC_{50, 14 \text{ dni}} = 0,28 \text{ mg/l}$; dla STZ: $EC_{50, 7 \text{ dni}} = 4,89 \text{ mg/l}$ vs. $EC_{50, 14 \text{ dni}} = 2,76 \text{ mg/l}$; dla SDIMID: $EC_{50, 7 \text{ dni}} = 1,74 \text{ mg/l}$ vs. $EC_{50, 14 \text{ dni}} = 0,85 \text{ mg/l}$).

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki analiz chemicznych (**Tabela 3**, [H12]) wykazano, iż niemożliwe jest w prosty sposób wytłumaczenie tego zjawiska ubytkiem formy natywnej leku w warunkach prowadzonego testu, bowiem wszystkie sulfonamidy ulegały w pewnym stopniu w trakcie tego testu fotodegradacji. O ile ten ubytek dla roztworów wzorcowych (przechowywanych w komorze fitotronowej dokładnie w tym samym czasie i warunkach w jakich prowadzony był test przedłużony) był mniejszy, to dla próbek pobieranych w trakcie i na zakończenie testu przedłużonego był on znacznie większy, co potwierdza możliwość biosorpcji/bioakumulacji tych leków na/w rzeście wodnej. Spodziewano się zatem, że powstające produkty rozpadu fotolitycznego i ich toksyczność mogą być przyczyną obserwowanych różnic. Toksyczność takich mieszanin podegradacyjnych określona została w warunkach 7 dniowego testu standardowego (wyniki zestawiono na **Rysunku 4**, [H12]). Również w trakcie tego eksperymentu przeprowadzono odpowiednie analizy chemiczne (**Tabela 3**, [H12]). Uzyskane wyniki potwierdziły, iż SAs w warunkach takiego „naświetlania” ulegają fotodegradacji. Jednak jedynie dla SDM i SMX zaobserwowano przy tym znaczący spadek toksyczności, w przeciwieństwie do trzech pozostałych leków, gdzie toksyczność utrzymywała się niemal na tym samym poziomie. Być może obserwowany efekt biologiczny wynika ze zmniejszonego stężenia biodostępnej dla organizmów frakcji danego leku lub też toksyczności powstających produktów degradacji. Biorąc pod uwagę wyznaczoną uprzednio stosunkowo niską toksyczność dwóch najczęściej powstających produktów fotodegradacji SAs [H10], mogących być przyczyną

obserwowanego spadku toksyczności, postanowiono sprawdzić ich obecność w pobieranych próbkach. Jednakże, nie dokonano ich identyfikacji w badanych próbkach. Z tych względów, o ile zaobserwowany spadek toksyczności SDM i SMX w warunkach testu chronicznego można wytłumaczyć ubytkiem ich formy biodostępnej dla organizmów i potencjalnie powstającymi produktami degradacji o mniejszej toksyczności, to w przypadku trzech pozostałych sulfonamidów (STZ, SDIMID i SMR) ta hipoteza jest niesłuszna. Wskazuje to tym samym na fakt, iż zagrożenie jakie niosą za sobą pozostałości tych trzech substancji mimo, ubytku ich formy natywnej, nie może być zredukowane, a nawet jak pokazują dane uzyskane w teście przedłużonym – może ono być zwiększone. Można zatem przypuszczać, iż przyczyną obserwowanych różnic w toksyczności chronicznej SAs wobec *L. minor* był inny mechanizm ich toksycznego działania i przenikania przez membrany biologiczne, który być może był powiązany z formą ich występowania, bowiem tylko dla tych trzech leków (SDIMID, STZ, SMR) udział procentowy formy obojętnej znacząco przekraczał 90 %, w stosunku do dwóch pozostałych (SMX, SDM) (Tabela 4, [H12]).

III. Podsumowanie

Uzyskane w toku przeprowadzonych badań wyniki, stanowiące podstawę osiągnięcia habilitacyjnego, pozwalają na sformułowanie następujących wniosków:

- Udowodniono, jak ważne i cenne jest dysponowanie oraz zastosowanie odpowiednich narzędzi analitycznych nie tylko do oceny stopnia narażenia (stopnia zanieczyszczenia czy analizy losu środowiskowego leków), ale też do charakterystyki zagrożeń jakie mogą one nieść dla środowiska (w badaniach ekotoksykologicznych – co pozwala na bardziej dogłębne zrozumienie obserwowanych przyczyn efektów biologicznych);
- Po raz pierwszy zasygnalizowano w badaniach nad oceną stopnia zanieczyszczenia pozostałościami leków problem konieczności wyznaczenia rozszerzonej niepewności uzyskiwanych wyników analitycznych, co ma szczególne znaczenie w analityce śladowych zanieczyszczeń środowiska, do których zaliczane są pozostałości farmaceutyków i powinno być rutynowo brane pod uwagę;
- Dzięki opracowanej metodyce oznaczania wybranych leków w wodach morskich oraz przeprowadzonym badaniom monitoringowym w strefie przybrzeżnej południowego Bałtyku, zwiększono stan wiedzy na temat zanieczyszczenia Morza Bałtyckiego tymi substancjami, co zostało już wzięte pod uwagę w niedawno opublikowanym raporcie

komisji helsińskiej HELCOM (2017) pt.: „*Pharmaceuticals in the aquatic environment of Baltic Sea region – A status report*”;

- Określono mobilność wybranych leków (z grupy beta-blokerów i leków cytostatycznych) w środowisku glebowym, co stanowi istotny wkład w stan wiedzy na temat ich losu środowiskowego;
- Zaprezentowano nowe dane toksykologiczne dla wielu związków dotąd nie w pełni wziętych pod uwagę w ocenie ryzyka środowiskowego;
- Po raz pierwszy zbadano wpływ zasolenia na toksyczność leków (sulfonamidów i trimetoprimu) wobec organizmów wodnych (glonów zielonych);
- Przeprowadzono pionierskie badania nad wyznaczeniem toksyczności mieszanin sulfonamidów i jednego ich produktu transformacji wobec glonów zielonych i rzęsy wodnej, a także benzimidazoli wobec rozwielitki, dowodząc ich istotności w interpretacji wyników;
- Dowiedziono istotnej zależności pomiędzy czasem narażenia (ekspozycji) organizmów na obecność sulfonamidów w środowisku wodnym a ich toksycznością;
- Dostarczono pulę nowych, oryginalnych danych analitycznych i toksykologicznych, które będą mogły być w przyszłości wykorzystane do dokonania pełnej oceny ryzyka środowiskowego wybranych grup leków.

Literatura

- [1] J. Oaks, M. Gilbert, M. Virani, R. Watson, C. Meteyer, B. Rideout, H. Shivaprasad, S. Ahmed, M. Iqbal Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A. Ahmed Khan, *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*, Nature, 427, 630-633, 2004.
- [2] Umweltbundesamt, <https://www.umweltbundesamt.de/en/database-pharmaceuticals-in-the-environment-0>, *Databse – Pharmaceuticals in the environment*, 2014.
- [3] CVMP (Committee for Medical Products for Veterinary Use), *Revised Guideline on the Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products in Support of the VICH GL6 and GL 38*, EMEA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, Londyn 2008.
- [4] VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medical Products), *Guideline GL 6 on Environmental Impact Assessment (EIAs) for Veterinary Medicinal Products - Phase I*, CVMP/VICH/592/98-FINAL, Londyn 2000.
- [5] VICH (International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medical Products), *Guideline GL 38 on Environmental Impact*

- Assessment for Veterinary Medicinal Products - Phase II*, CVMP/VICH/790/03-FINAL, Londyn 2005.
- [6] CHMP (Committee for Medical Products for Human Use), *Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medical Products for Human Use*, EMEA/CHMP/SWP/4447/00, Londyn 2006.
- [7] L. Molander, M. Ågerstrand, C. Rudén, *WikiPharma – A freely available, easily accessible, interactive and comprehensive database for environmental effect data for pharmaceuticals*, Regul. Toxicol. Pharm., 55, 367-371, 2009.
- [8] L. H. L. M. Santos, A. N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M. C. B. S. M. Montenegro, *Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment*, J. Hazard. Mater., 175, 45-95, 2010.
- [9] A. Kot-Wasik, J. Dębska, A. Wasik, J. Namieśnik, *Determination of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Natural Waters Using Off-Line and On-Line SPE Followed by LC Coupled with DAD-MS*, Chromatographia, 64, 13-21, 2006.
- [10] L. Vera-Candiotti, M. D. Gil Garcia, M. Martinez Galera, H. C. Goicoechea, *Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography-diode array detection*, J. Chromatogr. A 1211, 22-32, 2008.
- [11] M. Caban, N. Migowska, P. Stepnowski, M. Kwiatkowski, J. Kumirska, *Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of β -blockers and β -agonists in environmental samples*, J. Chromatogr. A, 1258, 117-127, 2012.
- [12] J. Tolls, *Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review*, Environ. Sci. Technol., 35, 3397-3406, 2001.
- [13] M. Ramill, T. El Aref, G. Fink, M. Scheurer, T. A. Ternes, *Fate of beta blockers in aquatic-sediment systems: sorption and biotransformation*, Environ. Sci. Technol., 44, 962-970, 2010.
- [14] OECD 106, *Guideline for the Testing of Chemicals, Adsorption-desorption using a batch equilibrium method*, Organization for Economic Cooperation and Development, Paryż 2000.
- [15] J. Maszkowska, A. Białk-Bielińska, K. Mioduszevska, M. Wagil, J. Kumirska, P. Stepnowski, *Sorption of sulfisoxazole onto soil - an insight into different influencing factors*, Environ. Sci. Pollu. Res., 22, 12182-12189, 2015.
- [16] A. Białk-Bielińska, J. Maszkowska, W. Mrozik, A. Bielawska, M. Kołodziejska, R. Palavinskas, P. Stepnowski, J. Kumirska, *Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: Their fate in natural soils*, Chemosphere, 86, 1059-1065, 2012.
- [17] OECD 111, *Guideline for the Testing of Chemicals, Hydrolysis as a function of pH*, Organization for Economic Cooperation and Development, Paryż 2004.
- [18] DIN 19527:2010-05, *Elution von Feststoffen – Schüttelverfahren zur Untersuchung des Elutionsverhaltens von organischen Stoffen mit einem Wasser/Feststoff-Verhältnis von 2 l/kg; Leaching of solid materials — batch test for the examination of the leaching behaviour of organic substances at a liquid to solid ratio of 2 L kg⁻¹*.
- [19] DIN 19528:2009-01, *Elution von Feststoffen – Perkulationsverfahren zur gemeinsamen Untersuchung des Elutionsverhaltens von organischen und anorganischen Stoffen; Leaching*

of solid materials — percolation method for the joint examination of the leaching behaviour of inorganic and organic substances.

- [20] Brooker, V., Halsall, C., Llewellyn, N., Johnson, A., Williams, R., *Prioritising anticancer drugs for environmental monitoring and risk assessment purpose*, *Sci. Total Environ.*, 473-474, 159-170, 2014.
- [21] EC–Directive 93/67/EEC, Commission of the European Communities, 1996. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances. Part II; Environmental Risk Assessment. Office for Official Publications of the European Communities, Luksemburg.
- [22] A. Białk-Bielińska, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, A. Boschen, P. Stepnowski, M. Matzke, *Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides*, *Chemosphere* 85, 928-933, 2011.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Moje pozostałe zainteresowania naukowo-badawcze wynikają z chęci ciągłego pogłębiania stanu wiedzy, jak i holistycznego spojrzenia na problem obecności w środowisku nietypowych, „nowopojawiających” się zanieczyszczeń środowiska. Wśród moich zainteresowań naukowych oprócz farmaceutyków znalazły się także substancje, takie jak ciecze jonowe. Każdorazowo za cel obieram dokonanie, w miarę możliwości, pełnej oceny ryzyka środowiskowego tych substancji chemicznych. Stanowią one kontynuację i znaczące rozszerzenie wcześniej podjętych przeze mnie badań przede wszystkim w ramach pracy doktorskiej. Te zainteresowania stały się podstawą uczestnictwa w kilku projektach badawczych, w których biorę i brałam udział zarówno charakterze kierownika (MNiSW 0012/IP3/2015/73), głównego wykonawcy (NCN DEC-2011/03/B/NZ8/03009), jak i wykonawcy (NCN DEC-2011/03/B/NZ8/03010, MNiSW N306 300536, MNiSW N204 260237). Spis wraz z krótką charakterystyką osiągnięć naukowo-badawczych zdobytych po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych przedstawiłam w **Rozdziale 5.1**, natomiast wykaz osiągnięć naukowo-badawczych zdobytych przed uzyskaniem tego stopnia zawarłam w **Rozdziale 5.2**.

5.1. Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych

Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze można podzielić na następujące obszary tematyczne:

A) Rozwój szeregu dodatkowych metodyk analitycznych i ocena stopnia narażenia na obecność innych grup leków w różnych komponentach środowiska (kontynuacja lub rozszerzenie badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego).

W ramach tego zadania badawczego opracowano i poddano procesowi walidacji szereg metodyk analitycznych do oznaczania m. in. leków weterynaryjnych, w tym stosowanych jako dodatki do pasz i/lub w hodowlach ryb (akwakulturach) w wodach powierzchniowych, osadach dennych i tkankach ryb [U1-U5]; antybiotyków w osadach dennych i wodach przydennych pobranych ze strefy przybrzeżnej Południowego Bałtyku [U6-U8]; oraz antybiotyków stosowanych w weterynarii w glebach pochodzących z rejonu Polski Północnej [U9] z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). W ramach tych badań przeprowadzono także ocenę wpływu składu matrycy na wielkość efektów matrycowych obserwowanych w podczas oznaczania wybranych sulfonamidów w różnych próbkach środowiskowych z zastosowaniem techniki LC-MS [U10] oraz podjęto się oceny możliwości zastosowania metod chemometrycznych do oceny efektywności procesu derywatywacji analitów podczas ich oznaczania z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej (GC-MS) [U11]. Zastosowanie opracowanych metodyk analitycznych pozwoliło na ocenę stopnia zanieczyszczenia różnych komponentów środowiska wybranych rejonów naszego kraju pozostałościami tych leków.

B) Studium potencjału i mechanizmu sorpcji wybranych sulfonamidów (kontynuacja badań rozpoczętych w ramach realizacji pracy doktorskiej) i beta-blokerów do gleb (kontynuacja i rozszerzenie badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego)

Badania te prowadzono zarówno w teście statycznym [U12-U14], jak i dynamicznym [U14] oraz obejmowały ocenę wpływu nie tylko takich czynników jak pH i siła jonowa [U12], ale także temperatury na proces sorpcji tych związków do gleb [U13].

C) Ocena stabilności innych leków w procesach degradacji biotycznej i abiotycznej (rozszerzenie badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego)

W ramach tego zadania badawczego dokonano oceny podatności na biodegradację leków przeciwcukrzycowych oraz zidentyfikowano podstawowe produkty rozpadu wybranych leków z tej grupy wraz z zaproponowaniem dróg ich rozpadu i oceną ekotoksykologiczną powstających mieszanin podegradacyjnych [U15-U16]. Dokonano także oceny stabilności hydrolitycznej innych leków weterynaryjnych o działaniu przeciwbakteryjnym w środowisku wodnym [U17].

D) Ocena ryzyka (eko)toksykologicznego innych substancji chemicznych, w tym leków, z wykorzystaniem baterii biotestów (kontynuacja lub rozszerzenie badań wchodzących w skład osiągnięcia naukowo-badawczego)

Dokonano kompleksowej oceny zagrożeń wynikających z obecności w środowisku różnorodnych substancji chemicznych: *i*) trzech najczęściej stosowanych w weterynarii fluorochinolonów (tj. enrofloksacyny, norfloksacyny i ciprofloksacyny) wobec organizmów wodnych tj. bakterii luminescencyjnych *Vibrio fischerii*, glonów zielonych *Scenedesmus vacuolatus*, rzęsy wodnej *Lemna minor* i rozwielitki *Daphnia magna* [U4]; *ii*) leków weterynaryjnych powszechnie stosowanych jako dodatki do pasz i w hodowlach ryb (metronidazolu, doramektyny, florfenikolu i oksytetracykliny) wobec ww. organizmów wodnych [U18]; *iii*) metylotrioksorenu(VII) i jego pochodnych [U19] oraz cieczy jonowych [U20]. W badaniach tych [U4, U18-19] również zastosowano techniki analityczne, dzięki którym uzyskano wyniki komplementarne do danych ekotoksykologicznych.

E) Poszukiwanie alternatywnych metod usuwania polarnych zanieczyszczeń z wód wraz określenie ekotoksyczności potencjalnych produktów degradacji

Moje zainteresowania badawcze skierowane zostały także na poszukiwanie alternatywnych do obecnie stosowanych metod/technologii oczyszczania ścieków, które charakteryzowałyby się większą efektywnością usuwania nie tylko pozostałości leków [U21], ale i cieczy jonowych [U20, U22]. Badania przeprowadzone w ramach prac [U20-U21] zostały przeprowadzone we współpracy z Katedrą Technologii Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego oraz Centrum Badań Środowiska i Zrównoważonych Technologii Uniwersytetu w Bremie. Oprócz standardowej oceny wydajności zaproponowanych procesów elektrolizy do usuwania wybranych sulfonamidów [U21] i cieczy jonowych [U20] z wód ściekowych, dokonano oceny ekotoksyczności mieszanin podegradacyjnych. Pozwoliło to na uzyskanie szerszego poglądu na temat wydajności/skuteczności proponowanej metody. Ponadto, dokonano także oceny zastosowania nanorurek węglowych jako potencjalnych adsorbentów do usuwania cieczy jonowych z matryc wodnych [U22].

F) Opublikowanie prac przeglądowych

Zdobyte podczas realizacji wyżej wymienionych prac doświadczenie naukowe i wiedza pozwoliły na przygotowanie i opublikowanie 12 prac przeglądowych dotyczących stanu wiedzy, problemów i wyzwań związanych z analityką pozostałości farmaceutyków w różnych

komponentach środowiska [U23-U35], jak i oceną stopnia narażenia i zagrożenia wynikającego z obecności wybranych leków w środowisku [U32-U34], w tym odnoszących się do ryzyka wynikającego z obecności sulfonamidów w środowisku glebowym [U32]. Pośród tych prac znalazła się także taka, w której dokonano podsumowania dostępnych danych dotyczących toksyczności mieszanin i chronicznej tej grupy leków w środowisku [U33].

Na wyróżnienie zasługuje niedawno opublikowana praca w *Trends in Analytical Chemistry* o charakterze eksperymentalno-przeglądowym, dotycząca wyznaczania różnymi metodami wartości pKa wybranych leków stosowanych w chemioterapii [U35]. Konieczność przeprowadzenia takich badań podyktowana była faktem, iż informacje zawarte w literaturze na temat właściwości kwasowo-zasadowych tych związków były niespójne, co wiązało się z niemożliwością dokonania pełnej interpretacji uzyskiwanych wyników badań.

Spis publikacji uzupełniających, które ukazały się po uzyskaniu stopnia doktora:

- [U1] M. Wagil, J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2015. A comprehensive approach to the determination of two benzimidazoles in environmental samples. *Chemosphere* 119, S35–41. **IF₂₀₁₅ = 3,698**
- [U2] M. Wagil, **A. Białk-Bielińska***, J. Maszkowska, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2015. Critical points in the evaluation of analytical methods based on liquid chromatography separation for the determination of doramectin in different environmental samples. *Chemosphere*, 119, S9-S15. **IF₂₀₁₅ = 3,698**
- [U3] M. Wagil, J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska***, M. Caban, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2015. Determination of metronidazole residues in water, sediment and fish tissue samples. *Chemosphere*, 119, S28-34. **IF₂₀₁₅ = 3,698**
- [U4] M. Wagil, J. Kumirska, S. Stolte, A. Puckowski, J. Maszkowska, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska**, 2014. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Science of the Total Environment*, 493, 1006-1013. **IF₂₀₁₄ = 4,099**
- [U5] J. Kumirska, M. Wagil, S. Stolte, M. Maksymiuk, A. Puckowski, J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska**, M. Caban, P. Stepnowski, 2016. Anthelmintics in the Aquatic

- Environment: A new Analytical Approach. *Current Analytical Chemistry*, 12, 227-236. **IF₂₀₁₆ = 1,306**
- [U6] G. Siedlewicz, **A. Białk-Bielińska**, M. Borecka, A. Winogradow, P. Stepnowski, K. Pazdro, 2017. Presence, concentrations and risk assessment of selected antibiotic residues in sediments and near-bottom waters collected from the Polish coastal zone in the southern Baltic Sea — Summary of 3 years of studies. *Marine Pollution Bulletin*, <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.10.075>. **IF₂₀₁₆=3,146**
- [U7] G. Siedlewicz, M. Borecka, **A. Białk-Bielińska**, K. Sikora, P. Stepnowski, K. Pazdro, 2016. Determination of antibiotic residues in southern Baltic Sea sediments using tandem solid-phase extraction and liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Oceanologia*, 58, 221-234. **IF₂₀₁₆ = 1,500**
- [U8] G. Siedlewicz, K. Pazdro, M. Borecka, K. Kornowska, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, 2014. Determination of tetracyclines residues in the Gulf of Gdańsk (southern Baltic Sea) sediments using a tandem solid-phase extraction with liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. [w:] *Insights on Environmental Changes* (Eds. T. Zieliński, K. Pazdro, A. Dragan-Górska, A. Weydmann), GeoPlanet: Earth and Planetary Sciences, 14, 33-48, ISBN 978-3-319-03683-0, Springer International Publishing, Szwajcaria.
- [U9] P. Łukaszewicz, J. Kumirska, **A. Białk-Bielińska**, J. Dołżonek, P. Stepnowski, 2017. Assessment of soils contamination with veterinary antibiotic residues in Northern Poland using developed MAE-SPE-LC/MS/MS methods. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 21233-21247. **IF₂₀₁₆=2,741**
- [U10] M. Borecka, **A. Białk-Bielińska**, G. Siedlewicz, P. Stepnowski, K. Pazdro, 2014. The influence of matrix effects on trace analysis of pharmaceutical residues in aqueous environmental samples. [w:] *Insights on Environmental Changes* (Eds. T. Zielinski, K. Pazdro, A. Dragan-Górska, A. Weydmann), GeoPlanet: Earth and Planetary Sciences, 14, 1-16, ISBN 978-3-319-03683-0, Springer International Publishing, Szwajcaria.
- [U11] J. Kumirska, A. Plenis, P. Łukaszewicz, M. Caban, N. Migowska, **A. Białk-Bielińska**, M. Czerwicka, P. Stepnowski 2013. Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1296, 164-178. **IF₂₀₁₃ = 4,258**
- [U12] J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska***, K. Mioduszevska, M. Wagil, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2015. Sorption of sulfisoxazole onto soil - an insight into different

- influencing factors. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12182-12189. **IF₂₀₁₅ = 2,760**
- [U13] J. Maszkowska, K. Mioduszevska, M. Wagil, P. Stepnowski, J. Kumirska, **A. Bialk-Bielińska**, 2014. Thermodynamic studies for adsorption of ionizable pharmaceuticals onto soil. *Chemosphere*, 111, 568-574. **IF₂₀₁₄ = 3,340**
- [U14] J. Maszkowska, M. Kołodziejka, **A. Bialk-Bielińska**, W. Mrozik, J. Kumirska, P. Stepnowski, R. Palavinskas, O. Krüger, U. Kalbe, 2013. Column and batch tests of sulfonamide leaching from different types of soil. *Journal of Hazardous Materials*, 260, 468-474. **IF₂₀₁₃ = 4,331**
- [U15] M. Markiewicz, Ch. Jungnickel, S. Stolte, **A. Bialk-Bielińska**, J. Kumirska, W. Mrozik, 2017. Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs. *Journal of Hazardous Materials* 16, 333, 154-161. **IF₂₀₁₆ = 6,065**
- [U16] M. Markiewicz, Ch. Jungnickel, S. Stolte, **A. Bialk-Bielińska**, J. Kumirska, W. Mrozik, 2017. Primary degradation of antidiabetic drugs. *Journal of Hazardous Materials*, 324, 428-435. **IF₂₀₁₆ = 6,065**
- [U17] P. Łukaszewicz, J. Kumirska, **A. Bialk-Bielińska**, J. Maszkowska, K. Mioduszevska, A. Puckowski, P. Stepnowski, 2016. Application of High Performance Liquid Chromatography for Hydrolytic Stability Assessment of Selected Antibiotics in Aqueous Environment. *Current Analytical Chemistry*, 12, 324-329. **IF₂₀₁₆ = 1,306**
- [U18] M. Kołodziejka, J. Maszkowska, **A. Bialk-Bielińska***, S. Steudte, J. Kumirska, P. Stepnowski, S. Stolte, 2013. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. *Chemosphere* 92, 1253-1259. **IF₂₀₁₃ = 3,499**
- [U19] S. Stolte, B. T. T. Ha, S. Steudte, V. Korinth, J. Arning, **A. Bialk-Bielińska**, U. Bottin-Weber, M. Cokoja, A. Hahlbrock, V. Fetz, R. Stauber, B. Jastorff, C. Hartmann, R. W. Fischer, F. E. Kühn, 2015. Preliminary Toxicity and Ecotoxicity Assessment of Methyltrioxorhenium and Derivatives. *Green Chemistry*, 17, 1136-1144. **IF₂₀₁₅ = 8,506**
- [U20] A. Fabiańska, **A. Bialk-Bielińska**, P. Stepnowski, S. Stolte, E. M. Siedlecka, 2014. Electrochemical degradation of sulfonamides at BDD electrode: kinetics, reaction pathway and eco-toxicity evaluation. *Journal of Hazardous Materials*, 280, 579–587. **IF₂₀₁₄ = 4,529**
- [U21] A. Pieczynska, A. Ofiarska, A. Fiszka Borzyszkowska, **A. Bialk-Bielińska**, P. Stepnowski, S. Stolte, E. M. Siedlecka, 2015. A comparative study of electrochemical degradation of imidazolium and pyridinium ionic liquids: a reaction pathway and

- ecotoxicity evaluation. Separation and Purification Technology, 156, 522-534. **IF₂₀₁₅ = 3,299**
- [U22] J. Wojsławski, **A. Białk-Bielińska**, M. Paszkiewicz, M. Toński, P. Stepnowski, J. Dołżonek, 2017. Evaluation of the sorption mechanism of ionic liquids onto multi-walled carbon nanotubes. Chemosphere, 190, 280-286. **IF₂₀₁₆=4,208**
- [U23] K. Pazdro, M. Borecka, G. Siedlewicz, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, 2016. Analysis of the Residues of Pharmaceuticals in Marine Environment: State-of the Art, Analytical Problems and Challenges. Current Analytical Chemistry, 12, 202-226. **IF₂₀₁₆ = 1,306**
- [U24] M. Caban, J. Kumirska, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, 2016. Analytical Techniques for Determining Pharmaceutical Residues in Drinking Water – State of Art and Future Prospect. Current Analytical Chemistry, 12, 237-248. **IF₂₀₁₆ = 1,306**
- [U25] M. Caban, J. Kumirska, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, 2016. Current Issues in Pharmaceutical Residues in Drinking Water. Current Analytical Chemistry, 12, 249-257. **IF₂₀₁₆ = 1,306**
- [U26] **A. Białk-Bielińska**, N. Migowska, M. Caban, J. Kumirska, M. Borecka J. Maszkowska, P. Stepnowski, 2015. Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku. Źródła występowania i wyzwania analityczne. Cz. I. Analityka 1, 65-68.
- [U27] M. Caban, **A. Białk-Bielińska**, M. Borecka, J. Kumirska, J. Maszkowska, N. Migowska, P. Stepnowski, 2015. Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku. Cz. II. Pobieranie i przygotowanie próbek do analizy. Analityka, 2, 56-61.
- [U28] J. Kumirska, M. Caban, N. Migowska, **A. Białk-Bielińska**, J. Maszkowska, M. Borecka, P. Stepnowski, 2015. Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku. Cz. III. Zastosowanie techniki chromatografii gazowej do oznaczania farmaceutyków w środowisku. Analityka 3, 56-61.
- [U29] **A. Białk-Bielińska**, M. Borecka, J. Kumirska, N. Migowska, M. Caban, J. Maszkowska, P. Stepnowski, 2015. Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku Cz. IV. Zastosowanie techniki chromatografii cieczowej do oznaczania farmaceutyków w środowisku. Analityka 4, 22-27.
- [U30] M. Caban, Ł. Haliński, **A. Białk-Bielińska**, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2015. Efekty matrycowe w chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas. Analityka 4, 4-7.

- [U31] M. Borecka, **A. Białk-Bielińska**, K. Pazdro, P. Stepnowski, 2013. Techniki izolacji i wzbogacania pozostałości wybranych leków weterynaryjnych z ciekłych próbek środowiskowych. *Analityka* 1, 56-60.
- [U32] **A. Białk-Bielińska***, J. Maszkowska J., A. Puckowski, P. Stepnowski, 2014. Exposure and Hazard Identification of Sulphonamides in the Terrestrial Environment [w:] *Environmental Risk Assessment in Soil Contamination* (Ed. M. C. Hernández-Soriano), ISBN 978-953-51-1235-8 InTech, Rijeka, Chorwacja, Rozdział 23, 657-693.
- [U33] **A. Białk-Bielińska***, J. Kumirska, P. Stepnowski, 2013. What do we know about the chronic and mixture toxicity of the residues of sulfonamides in the environment? [w:] *Organic Pollutants - Monitoring, Risk and Treatment* (Ed. M. N. Rashed), ISBN 978-953-51-0948-8, InTech, Rijeka, Chorwacja, Rozdział 3, 59-86.
- [U34] J. Maszkowska, **A. Białk-Bielińska**, M. Borecka, M. Caban, J. Kumirska, N. Migowska, M. Wagil, P. Stepnowski, 2016. *Analityka i ocena ryzyka występowania farmaceutyków w środowisku Cz. V – Ocena dróg przemieszczania, ryzyka ekotoksykologicznego oraz stopnia występowania farmaceutyków w próbkach środowiskowych pobranych na terenie Polski. Analityka* 1, 69-76.
- [U35] K. Mioduszevska, J. Dołżonek, D. Wyrzykowski, Ł. Kubik, P. Wiczling, C. Sikorska, M. Toński, Z. Kaczyński, P. Stepnowski, **A. Białk-Bielińska***, 2017. Overview of experimental and computational methods for the determination of the pKa values of 5-fluorouracil, cyclophosphamide, ifosfamide, imatinib and methotrexate, *Trends in Analytical Chemistry*, 97, 283-296. **IF₂₀₁₆=8,442**

5.2. Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych

Moje osiągnięcia-naukowo badawcze zdobyte przed uzyskaniem stopnia doktora nauk chemicznych związane były z realizacją pracy doktorskiej (w latach 2007 – 2015) i dostarczeniem istotnych danych na temat analityki [U1-U2], losu środowiskowego [U3-U4] i ekotoksyczności [U5] jednej grupy leków – sulfonamidów. Obejmowało to także opublikowanie dwóch prac przeglądowych z zakresu podstawowych problemów związanych z analityką pozostałości leków, w tym antybiotyków, w próbkach środowiskowych [U6-U7]. Dodatkowo we współpracy z innymi zespołami badawczymi, opracowano metody oznaczania glutationu i identyfikacji pochodnych akrydyny z wykorzystaniem techniki LC-MS [U8-U9].

Spis publikacji uzupełniających, które ukazały się przed uzyskaniem stopnia doktora

- [U1] **A. Białk***, J. Kumirska, R. Palavinskas, P. Stepnowski, 2009. Optimization of multiple reaction monitoring mode for the trace analysis of veterinary sulfonamides by LC–MS/MS. *Talanta* 80, 947–953. **IF₂₀₀₉ = 3,290**
- [U2] **A. Białk-Bielińska***, G. Siedlewicz, P. Stepnowski, K. Pazdro, A. Fabiańska, J. Kumirska, 2011. A very fast and simple method for the determination of sulfonamide residues in seawaters. *Analytical Methods*, 3, 1371-1378. **IF₂₀₁₂ = 1,547**
- [U3] **A. Białk-Bielińska**, S. Stolte, M. Matzke, A. Fabiańska, J. Maszkowska, M. Kołodziejka, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2012. Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions. *Journal of Hazardous Materials*, 221-222, 264-274. **IF₂₀₁₂ = 3,925**
- [U4] **A. Białk-Bielińska***, J. Maszkowska, W. Mrozik, A. Bielawska, M. Kołodziejka, R. Palavinskas, P. Stepnowski, J. Kumirska, 2012. Sulfadimethoxine and sulfaguanidine: Their fate in natural soils. *Chemosphere*, 86, 1059-65. **IF₂₀₁₂ = 3,137**
- [U5] **A. Białk-Bielińska***, S. Stolte, J. Arning, U. Uebers, A. Bösch, P. Stepnowski, M. Matzke, 2011. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere*, 85, 928-933. **IF₂₀₁₁ = 3,206**
- [U6] **A. Białk**, P. Stepnowski P., 2010. Analitka pozostałości antybiotyków w środowisku. *Analitka*, 1, 28-33.
- [U7] **A. Białk**, P. Stepnowski, 2008. Analitka pozostałości farmaceutyków w żywności i próbkach środowiskowych. *LAB*, 4, 6-14.
- [U8] N. Niedźwiecka, A. Mika, **A. Białk-Bielińska**, P. Stepnowski, E. Skorkowski, 2011. Effect of cadmium and glutathione on malic enzyme activity in brown shrimps (*Crangon crangon*) from the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia*, 53,1-13. **IF₂₀₁₁ = 1,242**
- [U9] K. Krzemiński, A. Roshal, B. Zadykiewicz, **A. Białk-Bielińska**, A. Sieradzan, 2010. Chemiluminogenic properties of 10-Methyl-9-(phenoxy-carbonyl)acridinium Cations in Organic Environments. *Journal of Physical Chemistry*, 114, 10550–10562. **IF₂₀₁₀ = 2,732**

5.3. Dalsze plany naukowe

Mimo wielu prac naukowych dostępnych na temat obecności i zagrożeń wynikających z obecności pozostałości leków w środowisku, temat ten nie jest w dalszym ciągu dostatecznie poznany. W przyszłości zamierzam kontynuować rozpoczęte zadania badawcze związane z obecnością produktów transformacji tych substancji leczniczych w środowisku. Pozwoli to na

bardziej dogłębne oszacowanie skali problemu związanego z obecnością leków i pośrednio także produktów degradacji i/lub metabolitów w środowisku. Tematyka ta stanowić będzie kontynuację projektu, którego byłam kierownikiem (MNiSW 0012/IP3/2015/73, 2012-2017) oraz realizowana będzie w ramach projektu badawczego, w którym obecnie biorę udział w charakterze wykonawcy (NCN UMO-2015/17/B/NZ8/02481, 2016 – 2019).

Mając na uwadze wspomniany powyżej cel zasadniczy (niezależnie od zadań badawczych przewidzianych w ww. projektach), zamierzam w dalszym ciągu doskonalić swój warsztat analityczny i dążyć do opracowania metodyk analitycznych do oznaczania jeszcze większej ilości analitów podczas jednego przebiegu analizy chromatograficznej (j. ang. *multi-analysis*) z uwzględnieniem form natywnych leków, produktów transformacji i wzorców znakowanych izotopowo. Do tego celu planuję wykorzystać technikę ultrasprawną chromatografię cieczową sprzężoną z spektrometrią mas (UHPLC-MS), aby skrócić w jak najbardziej możliwy sposób czas analiz i prowadzić rutynowe badania monitoringowe, które pozwoliłyby w jeszcze szerszym stopniu na uzyskanie informacji na temat stopnia zanieczyszczenia środowiska lekami i ich produktami transformacji. Zastosowanie takiej techniki wpisałoby się w zasady Zielonej Chemii Analitycznej poprzez skrócenie czasu analizy, oszczędność energii i ilości zużywanych rozpuszczalników oraz produkowanych odpadów, a także zmniejszeniem czasu pracy analityka. W tym kontekście zamierzam prowadzić analizy w dwóch trybach tzw.: analizę celowaną (j. ang. *target analysis*) i niecelowaną (j. ang. *non-target analysis*). Z tego względu planuję zastosować technikę ultrasprawną chromatografię cieczową w połączeniu z wysokorozdzielczym spektrometrem mas (UHPLC-Q-TOF), co pozwoli przede wszystkim na realizację zadania obejmującego poszukiwanie i identyfikację różnorodnych substancji obecnych w danych próbkach. Niezmiernie ciekawym byłoby też sprawdzenie czy możliwe byłoby wyznaczenie pewnych standardowych profili tych polarnych zanieczyszczeń w różnych typach próbek środowiskowych, co oprócz zastosowania omawianej techniki UPLC-Q-TOF, wymagałoby zastosowania dodatkowych technik spektroskopowych (NMR, IR) oraz metod chemometrycznych. Umożliwiłoby to katalogowanie i oznaczanie ilościowe jak największej liczby związków chemicznych w analizowanych próbkach oraz monitorowanie zmian w tych profilach na skutek zachodzących incydentów.

Ponadto, w dalszym ciągu niezwykle pasjonujące jest dla mnie poszukiwanie odpowiedzi na pytanie *Czy obecność leków, a tym samym i ich pochodnych, w środowisku niesie za sobą jakieś ryzyko?* Dlatego też zamierzam kontynuować podjęte badania nad oceną losu środowiskowego i toksyczności leków, ich produktów transformacji wobec różnych organizmów

ze szczególnym uwzględnieniem badań nad wyznaczeniem toksyczności ich mieszanin oraz efektów długofalowych, także dla mieszanin. Ocenę toksyczności mieszanin zamierzam rozszerzyć nie tylko o produkty transformacji leków, ale także inne powszechnie występujące w środowisku zanieczyszczenia, tak aby te badania modelowe jeszcze w większym stopniu odnosiły się do rzeczywistych warunków środowiskowych. Ponadto, dla wybranych substancji (o wysokim potencjale sorpcyjnym) zbadana zostanie także toksyczność wobec wybranych organizmów glebowych. Istnieje ogromna potrzeba prowadzenia takich badań, bowiem liczba danych na ten temat jest bardzo ograniczona.

Ostatecznie, chciałabym także kontynuować rozpoczęte badania nad poszukiwaniem skutecznych i wydajnych metod usuwania tych zanieczyszczeń środowiska wraz z oceną toksyczności powstających produktów mieszanin podegradacyjnych.

5.4. Zestawienie dorobku naukowego i innych osiągnięć

Stan na dzień 30.01.2018 r.	A. Przed doktorem	B. Po doktoracie	C. W tym do cyklu habilitacyjnego	Razem (A+B)
Indeks H (<i>Web of Science</i>)			14	
Liczba publikacji z listy filadelfijskiej	7	36	12	43
Liczba publikacji spoza listy filadelfijskiej	2	7		9
IF sumaryczny	19,079	138,906	50,494	157,985
Liczba cytowań (<i>Web of Science</i>)				
• bez autocytowań			142	427
• z autocytowaniem			151	503
Rola w publikacjach z cyklu habilitacyjnego				
• pierwszy autor			4	
• autor korespondencyjny			8	
• autor ostatni			4	
• inny			1	
Liczba rozdziałów w książkach	0	4		4
Liczba wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych				
• jako autor referujący	1	3		4
• jako współautor referatu ustnego	0	17		17
Liczba komunikatów plakatowych	43	61		104
Liczba realizowanych projektów w charakterze				
• kierownika	0	1		1
• wykonawcy (eksperta)	2	4		6



Anna Biak-Bielińska