

**ZAŁĄCZNIK 2a**  
**AUTOREFERAT**



**dr Piotr Kaczyński**  
**Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy**  
**Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku**

**Białystok 2018**

### 1. Imię i nazwisko, adres do korespondencji

Piotr Kaczyński  
Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy  
Terenowa Stacja Doświadczalna w Białymstoku  
Chełmońskiego 22, Białystok 15-195  
Tel. 85-678-54-72  
Tel. kom. 603-55-20-21,  
e-mail: [P.Kaczynski@iorpib.poznan.pl](mailto:P.Kaczynski@iorpib.poznan.pl)

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

**22 czerwca 2012 r. – doktor nauk rolniczych** w zakresie agronomii, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy  
Tytuł rozprawy doktorskiej: *Nowe deterenty pokarmowe – biologiczna aktywność wobec szkodników magazynowych w ujęciu modelowania molekularnego*  
Promotor – prof. dr hab. Bożena Łozowicka, Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

**29 czerwca 2005 r. – magister chemii**, Wydział Biologiczno-Chemiczny, Uniwersytet w Białymstoku  
Tytuł pracy: *Badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną związków o działaniu hipolipemicznym*

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

Praca w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym, Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku na stanowiskach:

- **inżynier** – od 2 stycznia 2006 r. do 31 grudnia 2006 r.
- **asystent** – od 1 stycznia 2007 r. do 30 czerwca 2012 r.
- **adiunkt** – od 1 lipca 2012 r.

- **kierownik ds. technicznych** w Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin w Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku - od 5 stycznia 2006 r. do 31 maja 2017 r.
- **kierownik Laboratorium** Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin w Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku - od 1 czerwca 2017 r.

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

**a) tytuł osiągnięcia naukowego:**

Osiągnięcie naukowe stanowi monotematyczny cykl siedmiu oryginalnych publikacji naukowych pod tytułem:

**„Optymalizacja i aplikacja pojedynczych oraz wielopozostałościowych metod oznaczania herbicydów w zróżnicowanych matrycach”**

**b) publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:**

**H1. Kaczyński P., Łozowicka B.:** One-step QuEChERS-based approach to extraction and cleanup in multiresidue analysis of sulfonylurea herbicides in cereals by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 2017, 10: 147-160. (IF<sub>2016</sub> – 2.038, MNiSW<sub>2016</sub> – 30 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu badań eksperymentalnych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników, napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy szacuję na 85%.*

**H2. Kaczyński P.:** Large-scale multi-class herbicides analysis in oilseeds by rapid one-step QuEChERS-based extraction and cleanup method using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 2017, 230: 411-422. (IF<sub>2016</sub> – 4.529; MNiSW<sub>2016</sub> – 40 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu badań eksperymentalnych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników, napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

**H3. Kaczyński P.,** Łozowicka B., Hryenko I., Wołejko E.: Behaviour of mesotrione in maize and soil system and its influence on soil dehydrogenase activity. *Science of the Total Environment*, 2016, 571: 1079-1088. (*IF*<sub>2016</sub> – 4.900, *MNiSW*<sub>2016</sub> – 40 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu analiz chromatograficznych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników, napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy szacuję na 75%.*

**H4. Kaczyński P.,** Łozowicka B., Perkowski M., Szabuńko J.: Multiclass pesticide residue analysis in fish muscle and liver on one-step extraction-cleanup strategy coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2017, 138: 179-189. (*IF*<sub>2016</sub> – 3.743, *MNiSW*<sub>2016</sub> – 30 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu analiz chromatograficznych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników, napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**H5. Łozowicka B., Ilyasova G., Kaczyński P.,** Jankowska M., Rutkowska E., Hryenko I., Mojsak P., Szabuńko J.: Multi-residue methods for the determination of over four hundred pesticides in solid and liquid high sucrose content matrices by tandem mass spectrometry coupled with gas and liquid chromatograph. *Talanta*, 2016, 151: 51-61. (*IF*<sub>2016</sub> – 4.162; *MNiSW*<sub>2016</sub> – 40 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, wykonaniu analiz techniką chromatografii cieczowej, współopracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy szacuję na 50%.*

**H6. Kaczyński P.,** Łozowicka B., Jankowska M., Hryenko I.: Rapid determination of acid herbicides in soil by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection based on dispersive solid phase extraction. *Talanta*, 2016, 152: 127-136. (*IF*<sub>2016</sub> – 4.162; *MNiSW*<sub>2016</sub> – 40 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu analiz chromatograficznych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników, napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

**H7. Kaczyński P.:** Clean-up and matrix effect in LC-MS/MS analysis of food of plant origin for high polar herbicides. *Food Chemistry*, 2017, 230: 411-422. (*IF*<sub>2016</sub> – 4.529; *MNiSW*<sub>2016</sub> – 40 pkt).

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji pracy, przeglądzie literatury, wykonaniu badań eksperymentalnych, opracowaniu metodyki badawczej z włączeniem walidacji metody, analizie i opracowaniu wyników, przygotowaniu rysunków i tabel, dyskusji wyników napisaniu pracy i przygotowaniu jej do druku. Mój udział procentowy wynosi 100%.*

Sumaryczny „*Impact Factor*” publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego według listy Journal Citation Reports (JCR), zgodnie z rokiem opublikowania wynosi **28.063**. Suma punktów za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, według wykazu czasopism naukowych MNiSW zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi **260**. Dla publikacji, które zostały opublikowane w 2017 roku zastosowano wskaźniki z roku 2016.

*Oświadczenia współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji, są zamieszczone w **Załączniku nr 3**.*

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

Herbicydy stanowią dominującą grupę środków ochrony roślin (ś.o.r.) stosowanych w produkcji rolniczej i ogrodniczej, posiadających zdolność niszczenia lub ograniczania wzrostu i rozwoju chwastów. Ponadto mogą być wykorzystywane w leśnictwie oraz do redukcji roślinności na szlakach komunikacyjnych czy ciekach wodnych.

Ocenia się, że w Polsce uprawom rolniczym zagraża około 300 gatunków chwastów jedno- i dwuliściennych. Konsekwencją zachwaszczenia pól, głównie konkurencyjnego oddziaływania chwastów na rośliny rolnicze, są straty w plonach rzędu 20-80% (Piekarczyk and Jaskulski, 2016). W celu przeciwdziałania tym niekorzystnym zjawiskom, z ekonomicznego punktu widzenia oczywista staje się potrzeba użycia preparatów o selektywnym działaniu chwastobójczym (Popp et al., 2013). Stosowanie ochrony herbicydowej uważane jest za najbardziej efektywny sposób odchwaszczania pól uprawnych, spośród dostępnych metod. Zastosowane prawidłowo, niszczą do 90% chwastów wrażliwych, a pozostałe przy życiu są mało żywotne i najczęściej nie wydają nasion, stając się tym samym niegroźne dla produkcji rolniczej (Czerniakowski and Czerniakowski, 1993).

W Polsce zarejestrowanych jest ponad 1800 preparatów (stan na dzień 30 czerwca 2017), z czego prawie połowę (893) stanowiły herbicydy. Wg. danych Eurostatu w Polsce, w latach 2011-2015, średnie roczne zużycie czystych substancji

czynnych (s.cz.) herbicydów wynosiło 12-13 tys. ton, podczas gdy fungicydów 6-7 tys. ton, a zoocydów tylko 1-1,5 tys. ton (EUROSTAT, 2016).

Zróznicowanie struktury chemicznej i właściwości, mechanizmu działania, trwałości w środowisku, dróg przenikania do roślin czy toksyczności sprawiają, że klasyfikacja herbicydów nie jest prosta. Międzynarodowa organizacja HRAC (ang. *Herbicide Resistance Action Committee*), zrzeszająca jednostki naukowo-badawcze oraz firmy fitofarmaceutyczne zainteresowane problematyką uodporniania się chwastów na herbicydy (HRAC, 2017) dokonała podziału substancji czynnych herbicydów w oparciu o ich mechanizm działania na rośliny (Tab.1). Według przyjętej klasyfikacji najliczniejszą grupę związków stanowią substancje czynne należące do grupy B, posiadające właściwości inhibitorów enzymu syntazy acetylmleczanowej (ALS). Powszechnie stosowany glifosat jest zaliczany do inhibitorów enzymu syntazy EPSP, grupa G.

Tabela 1. Klasyfikacja wybranych substancji czynnych herbicydów ze względu na mechanizm działania (wg. HRAC – *Herbicide Resistance Action Committee*)

Symbol literowy wg HRAC	Substancje czynna (s.cz.)	Mechanizm działania
A	chizalofop-P-etylowy, chizalofop-P-tefurylowy, cykloksydym, fenoksaprop-P-etylowy, fluazyfop-P-butyłowy, kletodym, pinoksaden, propachizafop, tepraloksydym, tralkoksydym	inhibitory enzymu ACCazy (graminicydy – uniemożliwiają wytwarzanie niezbędnych kwasów tłuszczowych w chwastach z rodziny traw)
B	amidosulfuron, chlorosulfuron, etametsulfuron metyłowy, flazasulfuron, florasulam, foramsulfuron, imazamoks, jodosulfuron metylosodowy, metosulam, metsulfuron metyłowy, mezosulfuron metyłowy, nikosulfuron, piroksysulam, propoksykarbazon sodowy, rimsulfuron, sulfosulfuron, tienkarbazon metyłowy, tifensulfuron metyłowy, triasulfuron, tribenuron metyłowy, triflusulfuron metyłowy, tritosulfuron	inhibitory syntazy acetylmleczanowej(ALS). (uniemożliwiają wytwarzanie niektórych aminokwasów niezbędnych do syntezy białek)
C1	chlorydazon, desmedifam, fendemifam, lenacyl, metamidron, metrybuzyna, terbulyloazyna	inhibitory fotosystemu II (uniemożliwiają produkcję cukru i energii na drodze fotosyntezy)
C2	chlorotoluron, izoproturon, linuron	
C3	bentazon, bromoksynil oktanowy, piridat	
D	dikwat	inhibitory fotosystemu I (uniemożliwiają produkcję cukru i energii na drodze fotosyntezy; niszczą błony komórkowe)
E	bifenoks, karfentrazon etyłowy, oksyfluorofen	inhibitory enzymu PPO (uniemożliwiają wytwarzanie chlorofilu; rozkładają błony komórkowe)

F1	beflubutamid, diflufenikan, flurochloridon	inhibitory syntezy barwników
F2	izoksafluton, mezotrion, sulkotrion, tembotrion, topramezon	
F4	chlomazon	
G	glifosat	inhibitory enzymu syntazy EPSP (uniemożliwiają biosyntezę niektórych aminokwasów)
H	glufosynat	inhibitory enzymu syntetazy glutaminowej (niszczą komórki w wyniku wzrostu stężenia amoniaku)
I	asulam	inhibitory enzymu DHP (zakłócają podziały komórkowe w czasie kiełkowania i początkowego wzrostu chwastów)
K1	pendimetalina, propyzamid	inhibitory tworzenia i funkcjonowania mikrotubuli (zakłócają podziały komórkowe w czasie kiełkowania i początkowego wzrostu chwastów)
K2	chloropofam	
K3	acetochlor, dimetachlor, dimetenamid-P, flufenacet, metazachlor, metolachlor-S, napropamid, petoksamid	inhibitory biosyntezy kwasów tłuszczowych odługich łańcuchach (VLCFA) (zakłócają podziały komórkowe w czasie kiełkowania i początkowego wzrostu chwastów)
N	etofumesat, prosulfokarb	inhibitory syntezy lipidów (w inny sposób niż grupa A)
O	2,4-D, aminopyralid, chinomerak, chlopyralid, dichloroprop-P, dikamba, fluorksypr, MCPA, MCPB, mekoprop, pikloram, trichlopyr	syntetyczne auksyny - regulatory wzrostu
Z	chinochlamina, siarczan żelaza	nieznany mechanizmu działania

Inna klasyfikacja szereguje substancje niszczące rośliny ze względu na ich działanie, selektywne i totalne. Zdecydowana większość herbicydów selektywne jedynie na określoną grupę roślin, np. wybrane gatunki dwuliścienne lub jednoliścienne. Wśród herbicydów wybiórczo działających najważniejszą grupą są tzw. inhibitory karboksylazy acetylo-CoA, enzymu zaangażowanego w syntezę kwasów tłuszczowych. Struktura enzymu karboksylazy jest odmienna u roślin jedno- i dwuliściennych, wobec czego mogą być stosowane selektywnie na chwasty jednoliścienne. Zahamowanie aktywności karboksylazy prowadzi do zatrzymania biosyntezy lipidów potrzebnych do budowy błon komórkowych. Herbicydy o tym mechanizmie działania po raz pierwszy pojawiły się na rynku w 1979 roku. Selektywne właściwości pozwalają wykonywać zabiegi na plantacjach w trakcie wegetacji, bez szkody dla roślin uprawnych.

Inną grupę stanowią tzw. herbicydy totalne, które są zdolne do niszczenia praktycznie wszystkiej roślinności, a więc wykorzystywane są tam, gdzie istnieje potrzeba redukcji wszystkich występujących gatunków, np. przed założeniem plantacji roślin uprawnych, torach kolejowych czy poboczach dróg, a w ostatnich latach, w głównej mierze do desykacji plantacji przed zbiorem. W chwili obecnej, najbardziej znane i powszechnie stosowane są dwa herbicydy nieselektywne: glifosat i glufosynat, występujące pod handlowymi nazwami *Roundup* oraz *Basta*, mającymi liczne inne odpowiedniki. Preparaty te zaczęto stosować na dużą skalę w chwili wprowadzenia na rynek roślin genetycznie modyfikowanych, odpornych na każdy z wymienionych związków. Przykładowo, zmodyfikowana genetycznie soja wykazuje ekspresję białka GAT nadającego tolerancję na herbicydy zawierające glifosat oraz białka GM-HRA nadającego tolerancję na herbicydy z grupy inhibitorów syntazy acetylomleczanowej (ALS). Inny rodzaj genetycznie modyfikowanej soi wykazuje zmniejszoną ekspresję enzymu omega-6-desaturazy, co skutkuje wysoką zawartością kwasu oleinowego i zmniejszoną zawartością kwasu linolowego; wykazuje także ekspresję zoptymalizowanego genu *Glycine max-hra*, nadającego tolerancję na herbicydy z grupy inhibitorów syntazy acetylomleczanowej (ALS). Glifosat hamuje aktywność enzymu EPSPS, syntazy 5-enolopirogronianio-szikimowo-3-fosforanowej, biorącego u roślin udział w biosyntezie trzech niezbędnych w produkcji białek aminokwasów: fenyloalaniny, tyrozyny i tryptofanu. Glufosynat (fosfotrycyna) hamuje natomiast aktywność syntetazy glutaminowej, co prowadzi do nagromadzenia w roślinnych tkankach zabójczych ilości amoniaku. Powszechne stosowanie w rolnictwie glifosatu i glufosynatu doprowadziło w ostatnich latach do pojawienia się chwastów odpornych na ich działanie – jest to jednak naturalny efekt wywierania silnej presji selekcyjnej w agrocenozie, niezwiązany ani z mechanizmem działania wspomnianych herbicydów, ani też z genetycznymi modyfikacjami roślin (Tao et al., 2017; Arias et al., 2017; Yannicari et al., 2015).

Inna klasyfikacja szereguje herbicydy ze względu na sposób działania miejscowy lub układowy/systemiczny. Każdy herbicyd, aby skutecznie wejść w interakcję z chwastami musi w odpowiednim stężeniu zostać przetransportowany do właściwego miejsca działania, gdzie zakłóci ich kluczowe procesy życiowe. Wchodzące w kontakt z chwastami herbicydy mogą być pobierane różnymi drogami: przez części naziemne – herbicydy nalistne; przez części podziemne – herbicydy doglebowe; oraz jednocześnie



przez części podziemne i naziemne – herbicydy nalistno-doglebowe. Typowymi herbicydami pobieranymi przez nadziemne części chwastów są związki o charakterze hydrofilowym ( $\log P < 2$ ) jak np. florasulam, mezotrion, czy glifosat; substancje czynne o charakterze słabych kwasów: MCPA, 2,4-D, chlopyralid, bentazon; oraz herbicydy sulfonilomocznikowe. Przykładami herbicydów, które pobierane są przez korzenie są: triazyny (np. terbutyloazyna), pochodne mocznika (np. linuron, chlorotoluron), karbaminiany (np. chlorprofam, pendimetalina).

Obok niewątpliwych korzyści ekonomicznych wynikających ze stosowania herbicydów ich użycie niesie ze sobą wiele zagrożeń. Nieracjonalne stosowanie środków chwastobójczych, poprzez takie ich cechy jak trwałość, zdolność do bioakumulacji, czy mobilność w środowisku, wpływa negatywnie na środowisko oraz zdrowie człowieka.

Do kompleksowej oceny zagrożeń wynikających z obecności herbicydów w środowisku, przewidywania ich losów i analizy ryzyka związanego z ich występowaniem niezbędna jest identyfikacja i oznaczanie zarówno związków macierzystych, jak i ich metabolitów oraz produktów powstających podczas procesów degradacji zachodzących w warunkach naturalnych. Zdarza się bowiem, że toksyczność metabolitów wielu herbicydów jest znacznie wyższa niż związku wyjściowego (Golombieski et al., 2016; Carles et al., 2017).

Dla każdej substancji czynnej stosowanej przy produkcji rolniczej określone są najwyższe dopuszczalne poziomy pozostałości (NDP). Bardzo często wartość NDP oprócz substancji macierzystej obejmuje sumę jej metabolitów oraz produktów rozkładu (EU, 2005). Ustalenie wartości NDP poprzedzone jest oceną ryzyka związanego z pobraniem pozostałości pestycydu wraz z produktami spożywczymi.

Liczne doniesienia naukowe wskazują na występowanie pozostałości herbicydów w żywności pochodzenia roślinnego: owocach i warzywach (Łozowicka et al., 2016; Szpyrka et al., 2015; Paulsen et al., 2017; Bakırcı et al., 2014); zbożach (Walorczyk, 2008, Lee et al., 2016); roślinach oleistych (Ballesteros et al., 2006) czy ziołach (Taha and Gadalla 2017; Liu et al., 2018). Ponadto wielokrotnie wskazywano na występowanie śladowych stężeń herbicydów oraz ich metabolitów w różnych elementach środowiska, takich jak: wody powierzchniowe, gruntowe oraz woda pitna (Herrero-Hernández et al., 2017; Kamata et al., 2017; Santos et al., 2013, Hladik et al., 2008), gleba (Stipičević et al., 2015; Silva et al., 2017; Scherr et al., 2017), osady denne (Devault et al., 2009; Calderon et al., 2016; Skiff et al., 2017), organizmy wodne (Golombieski et al., 2016; Hasenbein et

al., 2017, Reindl et al., 2015; Chang et al., 2016). Pozostałości tych związków odnotowane także w organizmach pożytecznych - pszczołach, traktowanych jako bioindykatory zanieczyszczenia środowiska (Hakme et al., 2017; López et al., 2016; Kiljanek et al., 2016). Niepokojący jest również fakt stwierdzenia obecności herbicydów w moczu (Conrad et al., 2017; Zouaoui et al., 2013), krwi (Wang et al., 2008; Chang et al., 2017), a nawet w mleku matek (Steinborn et al., 2016). Nieliczni autorzy wskazują na bezpośrednie zagrożenie herbicydami zdrowia i życia człowieka (Mesnage et al., 2015; Romano et al., 2012; Main et al., 2010). Do negatywnych skutków działania herbicydów można także zaliczyć niszczenie pożytecznej roślinności bytującej na danym obszarze (Grekul et al., 2005;), a także coraz powszechniejsze zjawisko uodporniania się chwastów na poszczególne substancje herbicydów (Greek and Owen, 2011; Schutte et al., 2017), wynikające głównie z niewłaściwego ich doboru i stosowania, przy jednoczesnym zaniechaniu metod zapobiegawczych oraz agrotechnicznych.

Monitorowane pozostałości herbicydów pochodzą niemalże ze wszystkich grup chemicznych: sulfonilomoczników (Ghobadi et al., 2015), fenylomoczników (Hasenbein et al., 2017), fekoksy kwasów (Skiff et al., 2017), chloroacetanikotów (Hladik et al., 2008) oraz tych, które charakteryzują się dużą trwałością jak triazyny (Calderon et al., 2016). Zachowanie odpowiedniego balansu pomiędzy stosowaniem herbicydów w produkcji rolniczej, a produkcją bezpiecznej żywności przy jednoczesnym zachowaniu troski o środowisko, jest zadaniem priorytetowym współczesnego rolnictwa. Do realizacji tego celu, niezbędnym jest wypracowanie analitycznego warsztatu badawczego umożliwiającego prowadzenie wiarygodnych badań monitoringowych w żywności oraz różnych elementach środowiska.

Obecnie lista substancji czynnych środków chwastobójczych jakie powinny być kontrolowane (EU 2012; 2014) przekracza sto pozycji i z roku na rok jest rozszerzana. Obserwuje się również trend do oznaczania oprócz substancji macierzystych również ich metabolitów na coraz niższych poziomach stężeń (poniżej 0,01 mg/kg).

W analizie pozostałości herbicydów kluczową rolę odgrywają metody wielopozostałościowe (ang. *multi-residue methods* - MRM), pozwalające na detekcję wielu związków równocześnie. Wymagania stawiane analizie wielopozostałościowej, to izolacja możliwie jak największej liczby pestycydów w jednym toku analitycznym, akceptowalne odzyski, efektywne usunięcie substancji interferujących w celu uniknięcia efektu matrycy, wzbogacenie analitu i poprawienie czułości, dobra precyzja, niski koszt,

a także szybkość, łatwość i bezpieczeństwo wykonania. Do tej pory, pomimo wyraźnego skoku technologicznego, wszelkie próby znalezienia jednej uniwersalnej metody nie sprawdziły się. Niektóre substancje czynne w dalszym ciągu wymagają stosowania procedur dedykowanych pojedynczym analitom (ang. *single-residue methods* - SRM), co generuje wysokie koszty badań i wydłuża czas analizy.

Badanie pozostałości składa się z dwóch podstawowych etapów – przygotowania próbki do analizy instrumentalnej oraz wykonania oznaczeń jakościowych jak i ilościowych, głównie technikami chromatograficznymi.

Pierwszy etap polega na wyizolowaniu pozostałości herbicydów z próbki i usunięciu substancji naturalnych w niej zawartych, przeszkadzających w wykonaniu analizy instrumentalnej. Jest on krytycznym punktem całego procesu analizy, ze względu na obecność w matrycy m. in. cukrów, lipidów, steroli, wosków, chlorofilu lub innych barwników oraz innych składników, zakłócających tło podczas analizy chromatograficznej. Organ Komisji Europejskiej, Generalna Dyrekcja ds. Zdrowia i Bezpieczeństwa Żywności w dokumencie SANTE 11945/2015 klasyfikuje produkty żywnościowe jako o: wysokiej zawartości wody; wysokiej zawartości kwasów i wysokiej zawartości wody; wysokiej zawartości cukrów i niskiej zawartości wody, wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości wody; wysokiej zawartości skrobi i/lub białka oraz niskiej zawartości wody i tłuszczu (SANTE 2016). Ze względu na złożony charakter matrycy etap ten jest bardzo istotny dla całej procedury gdyż decyduje o tym, czy obecne w próbce pozostałości zostaną w pełni wyodrębnione i zidentyfikowane podczas badań instrumentalnych. Sposób przygotowania zależy przede wszystkim od rodzaju oznaczanych substancji, ich rozpuszczalności w wodzie i rozpuszczalnikach organicznych, polarności, lotności czy trwałości. W literaturze naukowej można spotkać wiele różnych procedur przygotowania próbek. Najczęściej stosowanymi technikami ekstrakcji herbicydów z różnych matryc są ekstrakcja typu ciecz-ciecz, ekstrakcja do fazy stałej (Crespo-Corral et al., 2008), chromatografia żelowa (Patel et al., 2005) czy technika rozproszenia matrycy na fazie stałej (Ferrer et al., 2005; Łozowicka et al., 2009). Obserwowane obecnie trendy w przygotowaniu próbek zawierają w sobie użycie mniejszych naważek analitycznych, stosowanie przyjaznych środowisku metod oraz szybsze i mniej uciążliwe etapy przygotowania z dobrymi odzyskami i precyzją. W ostatnich latach powszechne zastosowanie w przygotowaniu próbek materiału roślinnego do analizy pestycydów znalazła metoda określana akronimem QuEChERS

(ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) zaproponowana przez Anastassiadesa i in. w 2003 roku (Anastassiades et al., 2003). Głównymi zaletami tej metodyki są szybkość, prostota, dobre odzyski pestycydów o różnych właściwościach fizykochemicznych przy niskim stężeniu w złożonych matrycach, oraz znaczna redukcja objętości używanych rozpuszczalników organicznych (Oshita and Jardim 2014). Przygotowanie próbki jest etapem w dużym stopniu decydującym o dokładności wyników analizy. Proces ten, często z powodu niedoskonałości technik instrumentalnych, bardzo często wymaga dodatkowego etatu oczyszczania czyli całkowitego lub częściowego usunięcia składników matrycy (ang. *clean-up*). Jednakże, ze względu na ogromną różnorodność matryc, w przypadku badanych pozostałości herbicydów, nie ma jednoznacznie określonych przepisów przygotowania próbek do analiz w sposób znormalizowany. Zespoły naukowców w laboratoriach oznaczających pozostałości pestycydów zmuszone są zatem same opracowywać metody analityczne na podstawie własnego doświadczenia czy też dostępnych publikacji naukowych. Dodatkowo nieustannie zmieniające się przepisy prawa oraz wprowadzanie na rynek nowych substancji czynnych wymuszają ciągły rozwój i doskonalenie procedur badawczych oraz dalsze poszukiwanie nowych, bardziej uniwersalnych metod.

Drugi etap procedury badawczej polega na zoptymalizowaniu warunków analizy instrumentalnej w sposób pozwalający na oznaczenie jakościowe i ilościowe jak największej liczby analitów z jak najlepszą czułością. W analizie pozostałości herbicydów wykorzystuje się głównie techniki chromatograficzne po to, by móc objąć zakresem badań jak największą liczbę substancji czynnych. Do końca XX wieku do badań wykorzystywano przede wszystkim chromatografy gazowe wyposażone detektory : wychwyty elektronów, azotowo-fosforowy, płomieniowo fotometryczny i detektor mas (Crespo-Corral et al., 2008 , Łozowicka et al., 2012, Santos-Delgado et al., 2000) oraz wysokociśnieniowe chromatografy cieczowe, z detektorami diodowymi (Chao et al. 2002; Zhou et al. 2006; Gallitzendorfer et al. 2011) lub fluorescencyjnymi (Qian et al., 2009). Wielkim przełomem w analizie pozostałości było pojawienie się pierwszych chromatografów gazowych i cieczowych z tandemową spektrometrią mas (GC-MS/MS; LC-MS/MS). Urządzenia te pozwalają na szybkie oznaczenie nawet do kilkuset związków i charakteryzują się wysoką czułością, bowiem przeważnie daje się za ich pomocą oznaczyć pozostałości pestycydów na poziomie 0,01 mg/kg lub niższym. W jednym biegu chromatograficznym można identyfikować, oznaczać i potwierdzać obecność

związku w próbce, co wpływa na skrócenie czasu analiz. Szczególnie ważny w analizie pozostałości okazał się chromatograf typu LC-MS/MS, ponieważ umożliwił oznaczanie pozostałości wielu związków polarnych, w szczególności pozostałości herbicydów i ich metabolitów, które wcześniej nastroczały poważne trudności analityczne (Gilbert-Lopez et al., 2010; Jiang et al., 2012; Lacina et al., 2012). Sporą nowością i dużą nadzieją w analizie pozostałości pestycydów jest również spektrometria mas czasu przelotu (TOF-MS) (Garcia-Reyes et al., 2007; Mezcua et al., 2009), ale na razie jeszcze trudno w pełni ocenić jej przydatność w tego typu analizie.

Opracowaną metodę można zastosować w badaniach pod warunkiem, że zostanie ona zwalidowana zgodnie z wytycznymi dotyczącymi walidacji metod i procedur kontroli jakości w analizie pozostałości pestycydów (SANCO 2014; SANTE 2016). W trakcie walidacji należy wyznaczyć dla badanych związków parametry metody, tj. selektywność, specyficzność, liniowość, dokładność, precyzję, powtarzalność i odtwarzalność, granicę oznaczalności oraz niepewność, przy czym parametry te muszą spełnić określone kryteria gwarantujące, że metoda jest wiarygodna, tzn. pozwala na osiąganie poprawnych wyników. Ponadto, stosowane metody badawcze powinny być zweryfikowane poprzez udział w badaniach biegłości, najlepiej międzynarodowych z dużą liczbą uczestników, w tym w corocznych badaniach biegłości, organizowanych przez właściwe krajowe i unijne laboratoria referencyjne (EU, 2004). Ze względu na ogromną wagę uzyskiwanych wyników, a w szczególności badań urzędowych, które w skrajnych przypadkach mogą decydować o zniszczeniu niebezpiecznej partii produktu, zagrażającej zdrowiu ludzi lub zwierząt, w Unii Europejskiej wprowadzono wymóg posiadania akredytacji przez laboratoria urzędowe, zgodnej z normą EN-ISO/IEC 17025 (EU, 2004). Ma to na celu zapewnienie stosowania w badaniach metod niezawodnych, gwarantujących wiarygodność uzyskiwanych wyników badań.

***Głównym kierunkiem badawczym podjętym w monotematycznym cyklu prac stanowiących szczególne osiągnięcie było opracowanie i optymalizacja metod izolacji/ekstrakcji oraz oznaczania herbicydów w oparciu o nowoczesne i efektywne techniki analityczne. Kontrola poziomów pozostałości herbicydów w płodach rolnych oraz elementach środowiska jest jednym z podstawowych narzędzi zapewnienia bezpieczeństwa zdrowia ludzi i zwierząt. Wielość oznaczanych związków, złożony charakter matryc oraz wymagane niskie granice oznaczalności***

*powodują, że powodują, że brakuje w dziedzinie analityki pozostałości herbicydów odpowiednich procedur analitycznych. Stąd istotną motywacją podjęcia opisanej powyżej tematyki badawczej, była potrzeba opracowania stosownych narzędzi analitycznych. Mając na uwadze powyższe zagadnienia podjęto:*

- Badania nad oceną efektywności izolacji/ekstrakcji i oczyszczania herbicydów z materiału roślinnego i środowiskowego*
- Badania nad dobrem warunków analizy chromatograficznej oraz parametrów detekcji herbicydów za pomocą tandemowej kwadrupolowej spektrometrii mas.*
- Badania walidacyjne zgodnie z obowiązującymi zaleceniami.*
- Badania aplikacyjne i wdrożeniowe opracowanych metodyk do badań rutynowych.*

Ze względu na zagrożenia wynikające z powszechnego stosowania, często w sposób nieracjonalny, herbicydów bezwzględnie należy monitorować ich pozostałości oraz metabolity i produkty przemian w płodach rolnych przeznaczonych do produkcji żywności i pasz, zapewniając przy tym bezpieczeństwo zdrowia ludzi i zwierząt oraz różnych elementów środowiska. Szczególną uwagę należy zwrócić na herbicydy charakteryzujące się bardzo wysokim zużyciem (np. glifosat, 2,4-D, MCPA, herbicydy sulfonilomocznikowe), wysoką trwałością (np. terbutyloazyna, dikwat, lenacyl, diflufenikan), a także tych, które są przedmiotem doniesień naukowych wzbudzających kontrowersje odnośnie ich szkodliwego wpływu na zdrowie ludzi i środowisko.

Szeroko wykorzystywaną w środkach ochrony roślin mających zastosowanie do powszechnego zwalczania chwastów dwuliściennych w zbożach, trawach nasiennych, kukurydzy grupą związków stanowią tak zwane herbicydy fenoksykwasowe (Tab 1, grupa O). Po raz pierwszy zostały zsyntetyzowane w 1945 r. Były to pochodne kwasu fenoksyoctowego, znane pod nazwami 2,4-D i MCPA, pierwsze selektywnie działające herbicydy pochodzenia organicznego. Kolejne, które uzyskano to pochodne kwasu fenoksymasłowego: MCPB, mekoprop i izomer mekoprop-P oraz dichloroprop i izomer dichloroprop-P. Ta popularna grupa substancji czynnych, określana jako herbicydy kwaśne (ang. *acidic herbicides* – HA), jest uzupełniona związkiem dikamba, pochodną kwasu benzoowego. Wraz z rozwojem herbologii do grupy inhibitorów wzrostu i



rozwoju w późniejszym okresie dołączyły pochodne kwasu pirydynokarboksyłowego, jak: aminopyralid, chlopyralid, fluroksypyr, pikloram i trichlopyr oraz chinomerak - pochodna kwasu chinolinokarboksyłowego. Działanie związków HA, które bardzo przypomina aktywność naturalnych hormonów roślinnych (auksyn) sprawia, że istnieje małe ryzyko pojawiania się odporności chwastów na te substancje (Praczyk and Skrzypczak 2004).

W 2012 roku sprzedaż HA stanowiła ponad 20% całkowitej sprzedaży herbicydów w Polsce (Dmochowska, 2013). Z uwagi na dość dużą w strukturze powierzchni liczbę gospodarstw małych i średnich, gdzie cena jest często podstawowym wyznacznikiem stosowanego poziomu ochrony, związki te jeszcze przez wiele lat będą z pewnością powszechnie wykorzystywane w odchwaszczaniu upraw. Ze względu na ich dobrą rozpuszczalność w wodzie związki te łatwo przemieszczają się przez ekosystem rolniczy, powodując w ten sposób zanieczyszczenie gleb, wód podziemnych i powietrza (Hua et al., 2006). Rozległe stosowanie tych herbicydów może w końcu wywierać poważne skutki dla środowiska oraz organizmy nie będące przedmiotem zwalczania (Koesukwiwat et al., 2008). Ogólnie HA wykazują umiarkowaną toksyczność; jednak niektóre chlorowane metabolity są bardzo toksyczne dla organizmów wodnych (Cserhati and Forgacs, 1998) i ludzi powodując poważne zaburzenia endokrynologiczne (McKinlay et al., 2008).

Jedną z najbardziej popularnych grup stosowaną w systemach rolniczych do przed- i powstosowowego zwalczania chwastów jedno- i dwuliściennych w uprawach stanowią herbicydy sulfonylomocznikowe (HSUs) (Tab 1, grupa B) (Brown, 1990; Hang et al., 2012). Pod względem chemicznym SUs reprezentują jednorodną grupę o ogólnym wzorze  $R1-NH-O=C-NH-SO_2-R2(-R3)$ , gdzie podstawik R3 jest kluczowym czynnikiem powodującym znaczne zmiany w selektywności względem poszczególnych gatunków chwastów. Sposób działania polega na zahamowaniu syntazy acetolaktonowej, jednego z kluczowych enzymów w szlaku biosyntezy takich aminokwasów jak: walina, leucyna i izoleucyna (Panten et al., 1996). Wraz z rosnącym zastosowaniem SUs, pojawił się problem ich pozostałości w płodach rolnych oraz ich wpływ na zdrowie ludzkie i środowisko. Jednocześnie mogą powodować znaczne uszkodzenia gatunków roślin innych niż docelowe, między innymi takich jak rzepak, powodując tym samym znaczne ograniczenia w uprawach następczych. Konsekwencją są ostrzejsze najwyższe

dopuszczalne poziomy pozostałości (NDP) niektórych HSUs, np. dla amidosulfuronu w pszenicy wartość NDP obniżono z poziomu 0,5 mg/kg do 0,01 mg/kg.

W ostatnich latach zużycie nieselektywnych herbicydów takich jak: glufosynat, glifosat, hydrazyd kwasu maleinowego, chlormekwat, diquat i mepiquat ciągle wzrasta ze względu na niskie koszty i wysoką skuteczność (EUROSTAT, 2016). Grupa ta, określana jako silnie polarne herbicydy (ang. high polar herbicides - HPH) jest powszechnie stosowana w nowoczesnej praktyce rolniczej do zwalczania chwastów, a także do desykacji upraw zbożowych, kukurydzy i rzepaku (Benbrook, 2016; EUROSTAT, 2016). Herbicydy te i ich metabolity są bardzo dobrze rozpuszczalne w wodzie i słabo rozpuszczalne w większości rozpuszczalników organicznych, wykazują niską toksyczność względem ssaków i nie powinny wywoływać niekorzystnych skutków zdrowotnych wobec ludzi (Townsend et al., 2017; Stephenson and Harris 2016). Jednak ich wpływ na zdrowie i środowisko budzi wśród różnych środowisk wiele kontrowersji i podlega ciągłej dyskusji, a część badań sugeruje ich szkodliwe działanie (Mesnage et al., 2015; Conrad et al., 2017).

Intensywne wykorzystanie agrochemikaliów, szczególnie herbicydów jest ważną metodologią wzrostu plonu. Dlatego też, opracowując metody analizy pozostałości tej grupy środków ochrony roślin szczególną uwagę należy poświęcić uprawom w produkcji których na dużą skalę prowadzi się ochronę herbicydową, bądź też ubocznym skutkom ich stosowania jakim jest zanieczyszczenie różnych elementów agroekosystemów.

Ponad 65% światowej produkcji rolnej stanowią zboża. Ochrona zbóż przed chwastami jest jedną z najważniejszych czynności w ich uprawie. Zmiany w strukturze zasiewów w Polsce prowadzą do dużej koncentracji zbóż, dlatego szkodliwość chwastów w zbożach jest sprawą oczywistą i bez ochrony herbicydowej nie uzyska się wysokich i dobrej jakości plonów. Ponadto, w ostatnich latach obserwuje się zmiany w stanie zachwaszczenia zbóż, np. wskutek zmian w technologii uprawy i zbioru czy w nawożeniu. Chwasty w zbożach zmniejszają ilość dostępnych składników pokarmowych dla roślin uprawnych, przez co maleje potencjał plonowania. Dodatkowo powodują wyleganie zbóż, co utrudnia ich zbiór. Idąc dalej, ziarno zbóż zanieczyszczone nasionami chwastów osiąga niższe ceny w skupie, ale również podawane w paszach wpływa niekorzystnie na zwierzęta gospodarskie.



W obrocie handlowym znajduje się wiele różnych herbicydów, co pozwala na ich wybór w zależności od stanu i stopnia zachwaszczenia i zapewnia ograniczenie występowania chwastów. Wśród herbicydów zwalczających chwasty dwuliścienne najbardziej popularne są tzw. regulatory wzrostu, czyli środki zawierające w swoim składzie 2,4-D, MCPA, dikambę, mekoprop, dichlorprop lub fluroksypyr. Bardzo często w praktyce rolniczej stosowane są herbicydy sulfonilomocznikowe (HSUs) charakteryzujące się szerokim spektrum zwalczanych gatunków chwastów.

W ostatnich latach obserwuje się wzrost powierzchni upraw roślin oleistych, w szczególności rzepaku. Jest to ściśle związane ze wzrostem opłacalności tych upraw, co wynika przede wszystkim z możliwości coraz szerszego wykorzystania nasion nie tylko w przemyśle spożywczym ale także do produkcji biopaliw. Z roślinami oleistymi związanych jest kilkadziesiąt gatunków chwastów, które różnią się między sobą trwałością, biologią, konkurencyjnością, wielkością itp. Należy tu cała grupa krzyżowych, rumianowatych, przetaczników, i in. Większość gatunków towarzyszy uprawie przez cały okres wegetacyjny, jak np.: gwiazdnica pospolita, fiołek polny, maruna bezwonna, rumianki, przytulia czepna, tasznik pospolity i tobołki polne, są również gatunki licznie występujące jesienią np.: samosiewy zbóż, komosa biała, gorczyca polna. Szkodliwość chwastów przy zaniechaniu pielęgnowania plantacji może skutkować obniżką plonów o 10-30% jednak przy braku ochrony straty mogą być znacznie większe. Uzyskanie wysokiego plonu uzależnione jest od starannej i prawidłowej agrotechniki oraz intensywnej ochrony przed chwastami, która w głównej mierze oparta jest o substancje czynne takie jak: aminopyralid, bifenox, chinomerak, chlomazon, chlopyralid, dimetachlor, dimetenamid-P, metazachlor, napropamid, pikloram, propyzamid.

Rośliną uprawną o stosunkowo dużym znaczeniu gospodarczym, pomimo iż w Polsce zajmuje tylko 2% w strukturze zasiewów, jest burak cukrowy. Wykorzystuje się go jako surowiec do produkcji cukru, a odpady z produkcji (wysłodki i melasa) są wykorzystywane w żywieniu zwierząt oraz w gorzelnictwie. Buraki cukrowe, ze względu na powolny wzrost we wczesnych fazach rozwojowych, narażone są na silną konkurencję ze strony chwastów. Dlatego zwalczanie chwastów jest bardzo ważnym czynnikiem plonotwórczym. W gospodarstwach uprawiających buraki cukrowe na dużą skalę utrzymanie plantacji nie zachwaszczonej, bez użycia środków chemicznych jest bardzo trudne, wręcz niemożliwe. Dlatego powszechnie stosuje się odchwaszczanie

chemiczne, w którym zaleca się stosowanie takich substancji czynnych jak: fenmedifam, desmedifam, etofumesat, lenacyl, metamitron, S-metolachlor, trialat, triflusulfuron metylowy, chlopyralid, chlorydazon, a z graminicydów do zwalczania chwastów jednoliściennych: chizalofop, fluozyfop, haloksyfop, propachizafop, chletodym, cykloksydym, teproloksydym. Tak intensywnie prowadzona ochrona niesie za sobą ogromne ryzyko wystąpienia pozostałości chemicznych środków ochrony roślin, zarówno w samym buraku jak i produktach jego przetwarzania.

Ubočnym skutkiem stosowania herbicydów jest zanieczyszczenie środowiska w którym mogą ulegać one różnym przemianom. Jednocześnie zachodzi też ich przemieszczanie między różnymi elementami środowiska. Herbicydy mogą być przemieszczane przez wiatr z miejsc zabiegów na sąsiednie uprawy i tereny, gdzie są nieporządanie lub szkodliwe. W swej pierwotnej formie lub w postaci produktów rozpadu przenikają do gleby i wody stanowiąc zagrożenie dla organizmów niebędących przedmiotem zwalczania.

Śladowe zawartości herbicydów w złożonych matrycach sprawiają, że zarówno etap przygotowania próbki jak i analizy instrumentalnej musi być specjalnie optymalizowany. Podczas opracowania procedury konieczna jest głęboka wiedza na temat właściwości badanych związków, jak również specyficznych cech matrycy w których są analizowane (np. białka czy tłuszczy). Umożliwia to odpowiedni dobór rozpuszczalników do ekstrakcji oraz sposób oczyszczania otrzymanego ekstraktu. Parametry fizyko-chemiczne badanych cząsteczek mają również istotny wpływ na warunki analizy instrumentalnej, takie jak dobór kolumny chromatograficznej, fazy ruchomej czy warunków detekcji.

Przegląd literatury, oraz własne doświadczenia wskazywały, że odpowiednią do realizacji zamierzonych celów oznaczania pozostałości herbicydów o zróżnicowanych właściwościach (prace **H1-H7**) będzie technika chromatografii cieczowej połączona z tandemową kwadropolową spektrometrią mas w trybie monitorowania wybranych reakcji MRM (ang. *multiple reaction monitoring*).

W pierwszym etapie badań opracowano i zoptymalizowano parametry detekcji. W tym celu roztwory wzorcowe poszczególnych herbicydów o stężeniu 0,1 µg/ml wprowadzono do spektrometru mas i określono parametry jego pracy. Pierwszym rozpatrywanym aspektem było określenie najbardziej właściwego sposobu jonizacji

(ESI – ang. *electrospray ionization*, APCI – ang. *atmospheric pressure chemical ionization*). Dla wszystkich badanych związków obserwowano znacznie niższą intensywność (wysokość i pole powierzchni pików), gdy stosowano jonizację APCI, w porównaniu do jonizacji ESI. Dlatego też w pracach **H1-H7** zastosowano jonizację na drodze elektrorozpraszania (ESI), dla której obserwowano największą intensywność sygnałów. Nie bez znaczenia był też tryb tworzenia jonów, ujemny czy dodatni. Ujemną jonizację wykorzystano w przypadku analizy herbicydów o charakterze kwaśnym (HA) (**H6 i H7**). W pozostałych przypadkach znacząco lepsze wyniki uzyskiwano w trybie rejestracji jonów dodatnich (**H1-H5, H7**). Istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność jonizacji był dodatek do roztworów wzorcowych niewielkich ilości mrówczanu amonu, który powodował znaczący wzrost sygnału detektora.

Pracując w trybie pełnego skanowania dla każdego analitu wybrano przejścia jon macierzysty – jon fragmentacyjny o największej intensywności, które wykorzystano do tworzenia przejść jon macierzysty – jon fragmentacyjny w trybie MRM. Warto dodać, że dla każdego herbicydu zaproponowano dwa takie przejścia, co znacznie zwiększyło wiarygodność analiz jakościowych i zapewniło jednoznaczną identyfikację analitów. W większości przypadków protonowane cząsteczki ( $[M+H]^+$ ) wybrano jako jony macierzyste, z wyjątkiem przypadków, gdzie względna intensywność adduktu amonowego ( $[M+NH_4]^+$ ) była zdecydowanie wyższa (butafenacyl, desmedifam, etofumesat, fluoroglikofen-etyl, izoksadifen-etyl i izoksaflutol) (**H2**).

W kolejnym etapie badano reakcje fragmentacji wybranych jonów, dobierając parametry detektora charakterystyczne dla każdego związku w następujących zakresach: potencjał rozgrupowania klastrów, energia zderzeń, oraz potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń. Dla wszystkich przypadków rejestrowano widma fragmentacyjne przy różnych wartościach energii zderzeń. We wszystkich przypadkach przyłożenie niskiej wartości energii kolizji prowadziło do powstania jonów fragmentacyjnych o wyższych masach cząsteczkowych. Zwiększenie wartości energii zderzeń skutkowało wzrostem intensywności sygnałów jonów fragmentacyjnych o niższych masach cząsteczkowych, a fragmenty o wyższych masach nie były obserwowane na widmach. Dla każdej pary MRM wybrano taką wartość energii kolizji, dla której uzyskano największą czułość.

Istotnym elementem prac prowadzonych nad doбором warunków detekcji MS/MS było określenie optymalnych parametrów źródła jonów: ciśnienia gazu

osłonowego, wspomagającego rozpylanie oraz pomocniczego, temperatury oraz napięcia przyłożonego do elektrody. Szczególnym wyzwaniem było dobranie w/w parametrów w przypadku analizy mieszanin 120 herbicydów (**H2**), czy też mieszanin herbicydów z innymi pestycydami (320 s.cz.) (**H4** i **H5**).

W wyniku przeprowadzonych badań wykazano, iż tandemowy kwadrupolowy spektrometr mas stanowi selektywny i czuły detektor, który pozwala na jakościową i ilościową analizę śladowych ilości pojedynczych lub zróżnicowanych grup herbicydów. Przeprowadzenie wiarygodnej analizy z zastosowaniem spektrometru mas na drodze złożonych kompleksowych badań wymagało określenia wpływu wielu czynników na intensywność sygnału pochodzącego od każdego badanego związku. W trakcie badań wykazano, że na efektywność jonizacji herbicydów w źródle jonów wpływają ich właściwości (m.in. *pKa*, polarność) oraz parametry pracy spektrometru mas (ciśnienia gazu osłonowego, wspomagającego rozpylanie oraz pomocniczego, temperatury oraz napięcia przyłożonego do elektrody).

Dalsze prace badawcze ukierunkowane były na opracowanie oryginalnych chromatograficznych metod rozdzielania herbicydów, będących przedmiotem osiągnięcia. W skład rozdzielanych mieszanin wchodziły związki o zróżnicowanych cechach fizyko-chemicznych (zróżnicowana lipofilowość, charakter kwasowo-zasadowy, różne rodzaje i ilości grup funkcyjnych w cząsteczce), które decydowały o ich właściwościach retencyjnych.

Optymalne warunki analizy chromatograficznej określono na podstawie dostępnych informacji na temat właściwości agalitów, takich jak: masa cząsteczkowa, wartość logP czy *pKa*. W trakcie badań dokonano oceny wpływu: rodzaju wypełnienia kolumny, jej temperatury; składu, pH fazy ruchomej oraz natężenia jej przepływu fazy ruchomej; programu elucji. Zasadniczym celem optymalizacji instrumentalnego procesu chromatograficznego było uzyskanie maksymalnego rozdzielania, najlepszej czułości oraz zadowalającej powtarzalności, przy jednoczesnym możliwie najkrótszym czasie analizy (do 30 minut). Pomimo, iż całkowite rozdzielanie sygnałów chromatograficznych współeluujących związków nie jest konieczne w stosowanym trybie MRM, to w znaczący sposób wpłynęło na zwiększenie czułości i selektywności metody poprzez zmniejszenie wpływu składników matrycy na wyniki pomiarów.

Odmienne czasy retencji poszczególnych analitów stanowiły dodatkowy parametr pozwalający na ich identyfikację w badanych próbkach.

Szczególny aspekt prowadzonych badań stanowił wybór odpowiedniej fazy stacjonarnej kolumny chromatograficznej do rozdzielania herbicydów w odwróconym układzie faz (**H1, H2, H4, H6, H7**). W tym celu przeprowadzono badania na szeregu kolumn o zróżnicowanych parametrach (długość, średnica, wielkość ziaren, polarność) dedykowanych do ultra-sprawnej chromatografii cieczowej. W przypadku metod analizy niewielkiej liczby herbicydów (do 40 s.cz.) (**H1 i H3**) zadowalające rezultaty osiągnięto stosując kolumnę z uniwersalnym wypełnieniem oktadecylowego C18 SunFire (75 mm x 2,1 mm, 2,5  $\mu\text{m}$ ). Jednakże rozszerzenie zakresu badawczego do 120 s.cz. herbicydów wymagało wydłużenia czasu analizy (do 50 minut). Otrzymane pasma chromatograficzne herbicydów zarejestrowane podczas analizy na kolumnie z wypełnieniem C18 były szerokie i asymetryczne, co istotnie wpłynęło na czułość metody. W efekcie końcowym rozdzielanie chromatograficzne 120 herbicydów (**H2**) przeprowadzono wykorzystując kolumnę typu *core-shell* Kinetex C18 (100 mm x 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ ). Wypełnienie tej kolumny stanowi stały nieporowaty rdzeń silikonowy na którym osadzona jest porowata warstwa krzemionki na powierzchni której immobilizowana jest monowarstwa dimetylo-n-oktadecylosilanu. Tak związana faza jest „*endcappowana*” za pomocą odpowiedniego odczynnika w celu maksymalnej dezaktywacji krzemionki. Wypełnienie to pozwoliło na uzyskanie bardzo wysokiej sprawności kolumny i osiągnięcie bardzo dobrych rozdzielczości pików. Dzięki zastosowaniu kolumny typu *core-shell* Kinetex C18 możliwe było rozbudowanie metody chromatograficznej, pozwalającej jednocześnie analizować ponad 340 substancji czynnych pestycydów (ponad 120 herbicydów, 130 zoocydów i 90 fungicydów), bez utraty czułości metody i symetrii pików (**H4 i H5**).

W trakcie prowadzonych prac badano również wpływ składników fazy ruchomej na parametry chromatograficzne. Główny składnik fazy ruchomej stanowiła woda, zaś jako modyfikatory organiczne stosowano zarówno metanol jak i acetonitryl. Z uwagi na fakt iż metanol i acetonitryl, jako składniki fazy ruchomej, dawały dobrą retencję badanych związków w kolumnie chromatograficznej do dalszych prac optymalizacyjnych wybrano metanol jako mniej kosztowny rozpuszczalnik (**H1, H2, H4**). Zastosowanie w fazie ruchomej dodatku modyfikatora kwasowego (kwasu octowego i mrówkowego) wpłynęło na poprawę retencji herbicydów. Lepsze wyniki

uzyskano po zastosowaniu kwasu mrówkowego, co uzasadniało jego wybór, jako dodatkowego składnik eluentu wpływającego na zwiększenie rozdzielania chromatograficznego i czułości metody. Na podstawie przeprowadzonych badań (**H1**, **H2**, **H4**) zaobserwowano również wpływ pH fazy ruchomej na retencję analitów. Wzrost selektywności rozdzielania, poprawa symetrii pików, a także zwiększenie czułości metody następowało wraz ze zmniejszaniem wartości pH. Aby uzyskać odpowiednie rozdzielanie mieszaniny dużej liczby zróżnicowanych pestycydów niezbędnym było zastosowanie elucji gradientowej. Modyfikacje programu gradientowego polegały na zmniejszaniu lub zwiększaniu początkowego stężenia modyfikatora organicznego fazy ruchomej. W pierwszej fazie elucji, gdy moc eluentu była słaba, dostatecznie dużą szybkość migracji osiągnęły związki o niskiej wartości logP, a więc o słabej retencji w odwróconym układzie faz (np. amidosulfuron, fenuron, metamitron, rimsulfuron). Odpowiednie skrócenie czasu przyrostu stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej skutkowało skróceniem czasów retencji najbardziej hydrofobowych pestycydów, poprawą kształtu pików, a przy tym nie wpłynęło na obniżenie sprawności układu chromatograficznego.

Opracowane i opisane w pracach **H1**, **H2**, **H4** i **H5** metody chromatograficzne charakteryzują się zadowalającą powtarzalnością czasów retencji, bez względu na ilość oznaczanych s.cz. i ich właściwości fizyko-chemicznych. Ponad to, zasadniczymi zaletami opracowanych metodyk jest przede wszystkim krótki czas analizy, a co za tym idzie niski koszt i zużycie rozpuszczalników.

Opracowania odrębnej metody chromatograficznej wymagała tzw. herbicydów kwaśnych – HA (2,4-D, MCPA, dikamba, chlopyralid, pikloram, ect.) (**H6**). Wszystkie HA w trakcie analiz chromatograficznych w warunkach opisanych w pracach **H1**, **H2** i **H4** wykazywały bardzo silną retencję. Uzyskane pasma chromatograficzne były szerokie i asymetryczne. Ostatecznie rozdzielanie chromatograficzne dla tej grupy związków przeprowadzono na kolumnie chromatograficznej o mniejszych cząsteczkach – 1,8  $\mu\text{m}$  (Zorbax Eclipse Plus C18 RR HT, 100 mm x 2.1 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) w stosunku do wyżej przytoczonych (**H6**). W ramach badań określono wpływ składników fazy ruchomej na parametry chromatograficzne. Główny składnik fazy ruchomej stanowiła woda, zaś jako modyfikatory organiczne testowano metanol i acetonitryl. Zastosowanie zarówno metanolu, jak i acetonitrylu prowadziło do uzyskania zadowalających efektów. Jednakże, w przypadku użycia acetonitrylu, uzyskane czasy retencji były o 30-40%



krótsze w porównaniu do metanolu. Z tego też względu w metodzie zastosowano acetonitryl, jako modyfikator fazy ruchomej, dzięki któremu uzyskano znacznie krótszy czas całkowitej analizy (z 18 na 10 minut). W trakcie badań oceniona także wpływ dodatku modyfikatora kwasowego do fazy ruchomej. Najlepsze wyniki uzyskano stosując dodatek kwasu octowego w ilości 1% (v/v). Zaś dodatek kwasu mrówkowego powodował znaczne pogorszenie rozdzielczości oraz symetrii pików (**H6**).

W trakcie badań określono także wpływ temperatury kolumny na parametry chromatograficzne. Czasy retencji badanej grupy HA malały wraz ze wzrostem temperatury. Spowodowane to było zmniejszeniem lepkości rozpuszczalnika, a także przyspieszeniem dyfuzji cząsteczek. Pomimo, iż wzrost temperatury wpływał na skrócenie czasów retencji HA, nie wpłynęło to na pogorszenie rozdzielczości. Zastosowanie wyższych temperatur kolumny spowodowało zmniejszenie szerokości oraz wzrost wysokości pików, tym samym wpływając na poprawę czułości metody (**H6**).

Zupełnie odrębnego podejścia wymagało opracowanie symultanicznej, wielopozostałościowej metody analizy grupy herbicydów o dużej polarności – HPH i ich metabolitów (**H7**). Dotychczas opisane w literaturze metody pozwalały na oznaczanie pojedynczych lub zaledwie kilku związków z tej grupy. Dlatego też zadanie to było szczególnym wyzwaniem. Pierwszym krokiem w prowadzonych badaniach był wybór odpowiedniej kolumny chromatograficznej. Oddziaływania HPH z długimi łańcuchami alkilowymi fazy stacjonarnej C18 były tak słabe, że anality eluowały praktycznie w martwym czasie analizy. Silnie polarne herbicydy wykazywały dobrą retencję w kolumnie z porowatym grafitowym złożem Hypercarb. Jednakże z w trakcie kolejnych analiz prowadzonych na kolumnie z tym wypełnieniem obserwowano znaczące poszerzanie się pików, co istotnie wpływało na czułość metody (**H7**). Uzyskane wyniki skłoniły do dalszej pracy nad udoskonalaniem metody oznaczania grupy HPH i ich metabolitów w oparciu o zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych – HILIC. Wypełnienie typu HILIC (Obelisc N, 100 mm x 2,1 mm, 5 µm) pozwoliło na uzyskanie bardzo wysokich sprawności kolumny i osiągnięcie bardzo dobrych rozdzielczości pików, przy wysokiej stabilności układu w trakcie analiz.

W ramach badań określono również wpływ składników fazy ruchomej na parametry chromatograficzne. Jako modyfikatory organiczne zastosowano zarówno metanol, jak i acetonitryl, a główny składnik fazy ruchomej stanowił wodny roztwór kwasu mrówkowego lub octowego. Wzrost stężenia rozpuszczalnika organicznego w

początkowym składzie eluentu powodował spadek siły elucji fazy ruchomej i zwiększenie czasu retencji grupy HPH. Wzrost stężenia kwasu w eluencie wpływał na spadek retencji badanych związków z uwagi na osłabienie oddziaływań elektrostatycznych z fazą stacjonarną. W wyniku zastosowania w fazie ruchomej dodatku modyfikatora kwasowego, uzyskano lepszy kształt pików (lepsza symetria oraz rozdzielczość). Nieco gorsze wyniki uzyskano po zastosowaniu kwasu octowego. Otrzymane wyniki uzasadniają wybór kwasu mrówkowego jako dodatkowego składnika eluentu wpływającego na poprawę rozdzielenia HPH i ich metabolitów. Badano również wpływ rodzaju i zawartości modyfikatora organicznego, natężenia przepływu fazy ruchomej, objętość dozowanej próbki, pH fazy ruchomej, stężenia roztworów mrówczanu i octanu amonu (**H7**).

W efekcie prowadzonych badań opracowano oryginalne warunki separacji chromatograficznej dla grupy polarnych herbicydów z wykorzystaniem kolumny typu HILIC oraz fazy ruchomej będącej mieszaniną acetonitrylu, 20mM mrówczanu amonu oraz 1% kwasu mrówkowego w wodzie w trybie elucji gradientowej (**H7**).

Kolejnym etapem prowadzonych badań było opracowanie metod izolacji i oczyszczania herbicydów z próbek materiału roślinnego oraz próbek środowiskowych. Zadanie to przysparza wielu trudności ze względu na występowanie pozostałości herbicydów w niewielkich stężeniach (ppm, ppb) w bardzo skomplikowanych matrycach (np. zboża, zioła, rośliny oleiste) zawierających dużą ilość substancji przeszkadzających (pigmenty, białka, tłuszcze czy węglowodany).

Jedną z głównych idei pracy **H1** było opracowanie prostej, stosunkowo szybkiej i taniej, a także ekologicznej metody ekstrakcji i oczyszczania oraz analizy pozostałości herbicydów sulfonilomocznikowych (HSUs) w ziarnach zbóż (**H1**).

Pierwotnie do izolacji 23 HSUs zastosowano technikę QuEChERS w formie zaproponowanej przez Anastassiadesa i wsp. (Anastassiades et al., 2003). Uzyskane wartości odzysków, które dla wszystkich HSUs mieściły się w przedziale 37–56%, jednoznacznie wskazywały na niezadowalającą wydajność procesu izolacji. W kolejnym etapie sprawdzono efektywność ekstrakcji wykorzystując dodatek buforu cytrynianowego (Lehotay et al., 2010), dzięki któremu uzyskano wyższe o 12-18% wartości odzysku, ale nadal nie spełniające kryteriów określonych przez Unię Europejską (SANCO, 2014). Dodatek do rozpuszczalnika organicznego kwasu mrówkowego (1%) w znaczący sposób wpłynął na poprawę efektywności ekstrakcji.



Zadowalające odzyski w zakresie 70-89% (przy RSD poniżej 15%) otrzymano dla wszystkich badanych HSUs (**H1**).

Kluczowym problemem jaki pojawił się w trakcie badań okazał się efekt matrycy, parametr ściśle związany ze stosowaniem techniki MS/MS. Zjawisko efektu matrycy polega na podwyższeniu lub obniżeniu (tzw. supresja jonów) intensywności sygnałów analitycznych na skutek interakcji pomiędzy powstającymi w interfejsie spektrometru mas jonami analitów a obecnymi w próbce cząsteczkami interferującymi (Matuszewski et al., 2003; Remane et al., 2010). Zjawisko to może skutkować otrzymaniem zafałszowanych wyników. Zastosowanie opisanego powyżej protokołu izolacji wiązało się z obecnością w ekstrakcie ko-ekstraktantów wywołujących silną supresję sygnałów analitycznych HSUs (49-61%) (**H1**). Sposobem na wyeliminowanie lub ograniczenie efektu matrycy (ME) jest w głównej mierze właściwe przygotowanie próbki do badań. Najczęściej proponowanym rozwiązaniem prowadzącym do jego redukcji jest wprowadzenie dodatkowego etapu oczyszczania opartego na wykorzystaniu różnego rodzaju sorbentów: PSA, GCB, C18, Florisil, grafen, tlenek cyrkonu, tlenek glinu, *ect.* (Gilbert-Lopez et al., 2010; Guan et al., 2013; Lacina et al., 2012; Moreno-Gonzalez et al., 2014; Wu et al., 2015). Niemniej jednak wiąże się to ze znaczącym wzrostem kosztów, a przede wszystkim wydłużeniem czasu analizy.

Ważnym osiągnięciem, a zarazem rozwiązaniem wspomnianych niedogodności, była zaproponowana w pracy **H1** strategia „*one-step*”, która polega na połączeniu etapu ekstrakcji z procesem oczyszczania. Jednocześnie, obok powszechnie stosowanego żelu oktadecylosilanowego C18, zaproponowano wykorzystanie chityny i ziemi okrzemkowej jako przyjaznych dla środowiska naturalnych sorbentów. W zależności od zastosowanego adsorbentu uzyskano różną efektywność oczyszczania w stosunku do wybranych HSUs. Wynikiem badań było wskazanie kilku różnic we właściwościach każdego z testowanych adsorbentów. Otrzymane rezultaty pozwoliły stwierdzić, że dla wybranych HSUs procent odzysku malał wraz ze wzrostem polarności sorbentu. Efekt ten jest konsekwencją występowania różnego rodzaju oddziaływań w układzie analit-sorbent. Analizując uzyskane z przeprowadzonych doświadczeń wyniki stwierdzono, iż zastosowanie chityny najskuteczniej redukowało efekt matrycy (od -19 do 13%) przy jednoczesnym zachowaniu wysokich wartości odzysku (80-109%) (**H1**).

Szczególnym wyzwaniem było podjęcie się opracowania metody pozwalającej na równoczesne oznaczanie w nasionach roślin oleistych 120 herbicydów należących do różnych grup chemicznych (**H2**). Pierwszą trudnością było osiągnięcie niskiej granicy oznaczalności (0,005 mg/kg) dla wszystkich badanych substancji czynnych. Po drugie, różnice w budowie chemicznej utrudniały opracowanie wspólnych warunków ich izolacji z matrycy. Pierwszy etap badań polegał na opracowaniu nowatorskiej procedury izolacji herbicydów bazującej na technice QuEChERS, która skutecznie zmniejszyłaby złożoność, pracochłonność i czasochłonność etapu ekstrakcji i czyszczenia próbki (**H2**). Z założenia powinien być bardzo prosty i nie wymagać żadnych dodatkowych kroków. Ponadto powinien zapewniać dobre odzyski i niskie efekty matrycy, szczególnie w przypadku złożonych próbek, takich jak nasiona roślin oleistych.

Zastosowanie zakwaszonego acetonitrylu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w obecności buforu cytrynianowego pozwoliło na skuteczne wyodrębnienie szerokiego spektrum herbicydów. Tylko dla 10% docelowych związków wartości odzysku nieznacznie wykraczały poza zakres 70-120%. Dowodzi to, że zastosowana metoda izolacji była skuteczna, jednakże nieodłącznie związana z obecnością koekstraktantów. Dla 62% wszystkich badanych herbicydów wartość ME wykraczały poza akceptowalny zakres -20-20% (**H2**). Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, przystąpiono do przetestowania kilku protokołów redukcji efektu matrycy (Anagnostopoulos and Miliadis, 2013; Jiang et al., 2012; Gilbert-Lopez et al., 2010; Guan et al., 2013; Lacina et al., 2012; Moreno-Gonzalez et al., 2014; Wu et al., 2015; Mol et al., 2008; Ferrer et al., 2011).

Jednym z najczęściej stosowanych sposobów bezpośredniego oczyszczania ekstraktów jest wymrażanie. Zasadniczo, sposób ten opiera się na różnicy temperatur topnienia pomiędzy wybranymi pestycydami (zwykle pomiędzy 150-300°C) a tłuszczami (poniżej 40°C). Współekstrahowane tłuszcze można oddzielić od pestycydów w trakcie zamrażania, podczas gdy pestycydy są nadal rozpuszczone w zimnym rozpuszczalniku organicznym. Wytrącone tłuszcze usuwa się z ekstraktów przez odwirowanie. Zastosowana strategia pozwoliła na osiągnięcie zadowalającej redukcji efektu matrycy dla zdecydowanej większości badanych herbicydów, jednocześnie wiązała się z obniżeniem odzysków poniżej 70% dla 59% badanych herbicydów (**H2**). Wynikało to z temperatur topnienia (Mp) niektórych herbicydów, które są względnie niższe od innych grup pestycydów. Najniższe odzyski uzyskano dla: fluazifopu - 15%

(Mp = -46°C), kletodymu - 18% (Mp = -80°C), metolachlor-S - 24% (Mp = -62°C), prosulfokarbu - 24% (Mp = -20°C), chlomazonu - 28% (Mp = 34°C) i acetochloru - 37% (Mp = 10,6°C). Dodatkowo istotną wadą tego sposobu był stosunkowo długi czas przygotowania próbki związany z zamrażaniem próbki.

Innym testowanym w tym badaniu sposobem redukcji efektu matrycy było rozcieńczanie (**H2**). Wyniki uzyskane dla współczynnika rozcieńczenia równego 2 pokazały, że duży odsetek herbicydów (54%) nadal wykazywał znaczący efekt matrycy. Sytuacja była lepsza, gdy współczynnik rozcieńczenia został zwiększony do 10. W tym przypadku większość herbicydów nie wykazywała istotnego tłumienia lub wzmocnienia sygnału chromatograficznego (78%). Ponadto odzysk 88% związków mieścił się w zakresie 70-120%. Z tego powodu rozcieńczenie próbki mogło być bardzo przydatnym podejściem do oczyszczania ekstraktów w analizie pozostałości herbicydów. Niestety metoda ta wykazała jedną znaczącą wadę: dziesięciokrotne rozcieńczenie spowodowało wprowadzenie mniejszych ilości badanych związków do układu analitycznego i zwiększyło limity wykrywalności i oznaczalności metody. Chociaż nowoczesne przyrządy LC-MS/MS są w stanie bardzo szybko wykryć ogromną liczbę pestycydów na poziomie ppt lub pbb, nadal trudno jest uzyskać dobrą czułość dla tak dużej liczby związków jednocześnie. W rezultacie, w przypadku niektórych związków, granica wykrywalności była wyższa niż najwyższe dopuszczalne poziomy pozostałości (NDP). W niniejszym badaniu (**H2**) siedem herbicydów (acetochlor, alachlor, dazomet, dimetenamid, florasulam, fluoroglikofen-etylu, tralkoksydim) miało wartości LOQ wyższe niż NDP określone przez Komisję Europejską dla rzepaku, nasion słonecznika i soi.

Zastosowanie standardowej dwuetapowej procedury ekstrakcji i oczyszczania opartej na mieszaninie PSA i C18 dało akceptowalne wartości efektu matrycy dla 69% badanych herbicydów (**H2**). Silne tłumienie sygnałów chromatograficznych obserwowano dla herbicydów sulfonilomocznikowych. Wzmocnienie zaś obserwowano dla grup: chloracetamidów, eterów difenyłowych i oksyacetamidów. Co więcej, zastosowanie sorbentu PSA/C18 miało znaczący wpływ na zmniejszenie odzysku. Dla 47% docelowych związków, wartości odzysku były poniżej 70%, szczególnie dla herbicydów fenyłomocznikowych i sulfonilomocznikowych. Zjawisko to wynika ze słabych właściwości kwasowych tych związków, które sprzyjały adsorpcji przez PSA. Zdecydowanie lepsze wyniki uzyskano w przypadku zastosowania chityny jako

sorbentu d-SPE. Obecność specyficznych grup funkcyjnych (karbonylowa, amidowa, enolowa, eterowa), na powierzchni sorbentu skutecznie redukowała zanieczyszczenia z matrycy tłuszczowych. Ponad 89% wszystkich herbicydów wykazywało zadowalające ME. Ponadto sorbent nie wpływał niekorzystnie na poziomy odzysku. Zastosowanie jednoetapowe podejścia QuEChERS (*one-step*) do ekstrakcji i oczyszczania za pomocą chityny zaproponowane w pracy **H1** pozwoliło na uzyskanie satysfakcjonujących parametrów metody izolacji znacznie szerszej grupy 120 herbicydów z nasion roślin oleistych (**H2**). Obliczone efekty matrycy zawierały się między -36% a 37%, a ME poza dopuszczalnym zakresem -20-20 obserwowano tylko dla 18% wszystkich badanych herbicydów. Uzyskane wartości odzysku tylko dla dziesięciu docelowych związków były poniżej 70% i zawierały się w przedziale 52-69%. Analizując wyniki badań stwierdzono silną zależność pomiędzy obserwowanym efektem matrycy a właściwościami fizykochemicznymi badanych herbicydów. Wyraźną supresję sygnału analitycznego zaobserwowano dla większości związków z wartością parametru logP poniżej 2. Wzrost wartości logP powyżej 2 powodował wzmocnienie sygnału. Ponadto zaobserwowano również związek między ME a czasem retencji. Ogólnie rzecz biorąc, efekty tłumienia sygnału towarzyszyły herbicydom o krótkim czasie retencji. Z drugiej strony obserwowano wzmocnienie sygnału przy dłuższych czasach retencji (**H2**). Nowatorstwo, a zarazem trudność opracowanej metodyki wiązała się z koniecznością równoczesnej izolacji, oczyszczania i oznaczania herbicydów o zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych z zastosowaniem jednej optymalnej procedury. Uzyskane wyniki mogą stanowić bazę danych przy wstępnym wyborze sposobu oczyszczania ekstraktów z matrycy o wysokiej zawartości tłuszczów. Jest to po raz pierwszy opisana w literaturze naukowej metoda umożliwiająca wydajną jednoetapową ekstrakcję i oczyszczanie 120 herbicydów o różnych typach struktur i polarnościach (**H2**).

Kontynuacją przedstawionych w pracach **H1** i **H2** badań był dalszy rozwój metody w kierunku możliwości analizy pozostałości herbicydów w materiale biologicznym jaki stanowią tkanki ryb (**H4**). Ryby są cennym źródłem składników odżywczych w diecie ludzi i zwierząt, a obecność w nich zanieczyszczeń pestycydowych może powodować problemy zdrowotne (Granados-Galván et al., 2015; Robinson et al., 2016; Wang et al., 2013; Wine et al., 2012; Yohannes et al., 2014). Ponadto ryby są

swoistymi bioindykatorami stanu ekosystemów wodnych, ponieważ gromadzą zanieczyszczenia bezpośrednio z wody i diety. Zwłaszcza lipofilowe pestycydy mogą ulegać bioakumulacji w tkankach tłuszczowych i wejść do łańcucha pokarmowego (Panseri et al., 2013). Opisaną w pracy **H2** metodę po niewielkich modyfikacjach zaadoptowano do analiz pozostałości herbicydów w tkankach mięśni ryb (**H4**). Jednocześnie z powodzeniem wykorzystano ją w dalszych badaniach zmierzających do rozszerzenia zakresu analizowanych związków o pestycydy z grup zoocydów (130 substancji) i fungicydów (90 substancji) w tymże materiale (łącznie 340). Pewne trudności nastęrczała analiza tkanki wątroby ryb. Z uwagi na wysoką zawartość białka, tłuszczu i pigmentów dla części z badanych związków obserwowano bardzo silny efekt matrycy. Zjawisko to prawie całkowicie wyeliminowano modyfikując skład sorbentu wprowadzając obok chityny nieznaczne ilości grafityzowanego węgla aktywnego (1g chityny + 50mg węgla aktywnego). Opublikowana praca (**H4**) stanowi jedną z nielicznych publikacji opisujących wieloskładnikową metodę oznaczania pozostałości pestycydów, a zwłaszcza tak szerokiego zakresu herbicydów, w tkankach mięśni i wątroby ryb.

Realizowane w ramach pracy **H5** badania dotyczyły opracowania alternatywnych metod izolacji i oczyszczania ponad czterystu pestycydów (w tym 120 herbicydów) z matrycy o wysokiej zawartości cukrów, tj. buraka cukrowego i melasy buraczanej. W badaniu porównano dwie metody: metodę rozproszenia matrycy na fazie stałej - MSPD (ang. Matrix Solid Phase Dispersion) oraz technikę QuEChERS.

W zoptymalizowanej procedurze MSPD próbkę homogenizowano razem z sorbentem – Florisil, dzięki czemu została ona całkowicie zdyspergowana na jego powierzchni. Kolejnym etapem procedury była równoczesna ekstrakcja i oczyszczenie z wykorzystaniem żelu krzemionkowego na szklanej kolumnie chromatograficznej. Najlepsze wyniki uzyskano, gdy anality ekstrahowano przy użyciu kolejno mieszanin: heksanu/acetonu (8:2, v/v) oraz eteru dietylowego/acetonu (8:2, v/v) dla melasy buraczanej. W przypadku buraka dodatkowo należało użyć mieszaniny heksanu/eteru dietylowego/acetonu (1:2:1, v/v/v). Połączenie dwóch sorbentów (żelu krzemionkowego i Florisilu) pozwoliło na uzyskanie dobrej skuteczności metody zarówno dla niepolarnych i polarnych pestycydów w przypadku buraka cukrowego. W przypadku melasy, konieczne okazało się dalsze oczyszczanie, które przeprowadzono techniką chromatografii kolumnowej z żelem krzemionkowym. Wadą tego sposobu była

jego wieloetapowość oraz konieczność dodatkowego oczyszczenia ekstraktu na szklanej kolumnie (H5).

W przypadku techniki QuEChERS zastosowanie protokołu ekstrakcji opisanego w pracach H1 i H2, opartego o wykorzystanie zakwaszonego acetonitrylu jako rozpuszczalnika ekstrakcyjnego w obecności buforu cytrynianowego pozwoliło na skuteczne wyodrębnienie szerokiego spektrum herbicydów. Zastosowana metoda ekstrakcji była skuteczna, jednakże była nieodłącznie związana z obecnością koekstraktantów (H5). Współekstrahowana sacharoza negatywnie wpływała na przebieg analizy instrumentalnej powodując występowanie wzmożonego efektu matrycy. W przypadku buraka cukrowego interferenty skutecznie (bez negatywnego wpływu na odzysk) wyeliminowano stosując procedurę wymrażania. Zaś w przypadku melasy buraczanej: usunięcie cukrów, lipidów i substancji barwnych wymagało zastosowanie etapu oczyszczania dyspersyjną ekstrakcją do fazy stałej za pomocą mieszaniny PSA, GCB i siarczanu magnezu (H5).

Metoda MSPD była skuteczna, ale wymagała zużycia znacznie większej ilości rozpuszczalników i była bardziej pracochłonna, co skutkowało względnie wyższymi kosztami analiz. Dla porównania, technika QuEChERS była dwukrotnie tańsza i trzykrotnie szybsza (H5).

Dużym wyzwaniem było opracowanie warunków symultanicznej ekstrakcji herbicydów kwaśnych - HA ze skomplikowanej matrycy jaką stanowi gleba (H6). Większość form użytkowych środków ochrony roślin opartych na HA zawiera ich substancje czynne w formie estów oraz soli (głównie sodowych lub amonowych), natomiast ich pozostałości zdefiniowane są jako wolne kwasy (EU, 2005). Wymusiło to wprowadzenie do etapu przygotowania próbki hydrolizy poprzedzającej właściwą ekstrakcję techniką QuEChERS. Próbkę o niskiej wilgotności, takie jak np. gleba, wymagają dodania wody przed ekstrakcją w celu osłabienia oddziaływań pestycydów z matrycą, ponadto dodatek wody był niezbędny do przeprowadzenia reakcji hydrolizy. Z uwagi na fakt, iż część HA jest nietrwała w warunkach wymaganych do hydrolizy kwasowej (Legana et al., 1998) w badaniach zastosowano hydrolizę zasadową, która w odróżnieniu od kwasowej jest nieodwracalna. Uzyskane w trakcie badań odzyski metody bez etapu oczyszczania dla wszystkich związków mieściły się w przedziale 73-106% i spełniały kryteria zawarte w przewodniku SANTE/11945/2015 (H6). Niestety,



również dla wszystkich badanych HA efekt matrycy były poza akceptowalnym zakresem -20-20%, a wartości wynosiły od 18-70%. Tak więc, oczyszczanie ekstraktu glebowego było niezbędne w celu zminimalizowania tego zjawiska. Spośród przetestowanych jedenastu różnych sorbentów i ich mieszanin zróżnicowanych pod względem właściwości adsorbujących najefektywniejsze okazało się zastosowanie kwaśnego tlenku glinu (**H6**). Ważnym osiągnięciem w pracy **H6** jest propozycja wprowadzenia parametru określającego całkowitą efektywność procesu ekstrakcji i oczyszczania próbki – PE (*process efficiency*), uwzględniającego takie parametry metody jak odzyski i efekt matrycy ( $PE = (RE \times ME)/100$ ). Wartości PE zbliżone do 100% wskazują na zadowalające wartości odzysku oraz wpływu efektu matrycy.

Założonym celem kolejnej pracy (**H7**) było opracowanie prostej i efektywnej symultanicznej rutynowej metody ekstrakcji silnie polarnych herbicydów (HPH) i ich głównych metabolitów w różnych produktach pochodzenia roślinnego. W pierwszym kroku tych badań testowano efektywność rozpuszczalników do ekstrakcji: wody, metanolu, acetonitrylu i ich mieszanin. Oceniono także dodatek modyfikatora kwasowego na wydajność izolacji HPH. Optymalizacji poddano również masę naważki oraz objętość rozpuszczalnika ekstrahującego. Finalnie, przygotowanie próbek do analizy polegało na ekstrakcji próbki (10g) mieszaniną metanolu i wody (w proporcji 1:1) z dodatkiem 0,5% kwasu mrówkowego. Efektywność ekstrakcji oceniono poprzez wyznaczenie odzysków metody. W badaniach tych weryfikowano również wpływ efektu matrycy na wyniki analiz. Uzyskane rezultaty jednoznacznie wskazywały na występowanie silnego efektu matrycy. Podjęto zatem działania mające na celu tego zjawiska poprzez wprowadzenie etapu oczyszczania ekstraktu techniką dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej stosując Florisil, grafityzowany węgiel aktywny, C18, chitosan oraz grafen jako potencjalne sorbenty. Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie chitosanu lub grafenu zapewnia dobrą skuteczność oczyszczania bez redukcji odzysku (**H7**). Opracowana procedura charakteryzuje się dużą selektywnością, ponieważ nie obserwowano silnych interferencji pochodzących od składników matrycy na sygnały analityczne analizowanych związków.

Opracowane metody zostały poddane walidacji zgodnie z wymaganiami określonymi w przewodnikach SANCO/12571/2013 oraz SANTE/11945/2015

„Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed”. Celem procesu było określenie zakresu ich przydatności oraz ocena wiarygodności. Wyznaczono następujące parametry charakteryzujące opracowane metody: odzysk, precyzję, liniowość, granicę wykrywalności i oznaczalności, efekt matrycy oraz niepewność.

Głównym kryterium udokumentowania wiarygodności metody analitycznej było badanie stopnia odzysku badanych związków. Wyniki przedstawione w pracach **H1-H7** oraz niniejszym autoreferacie wskazują na ogromne znaczenie rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji analitów z próbek oraz sposobu oczyszczania próbki. W badaniach odzysku zastosowano opisane w pracach **H1-H7** zoptymalizowane procedury przygotowania próbek, a na podstawie otrzymanych wyników wykazano, że odzysk w dużej mierze zależy nie tylko od rodzaju analitu, lecz także od jego stężenia w ekstrahowanej próbce. Otrzymane wyniki wskazują na dużą skuteczność izolacji badanych herbicydów z wybranych z matryc przy zastosowaniu opracowanych procedur przygotowania próbek. Każda opracowana procedura analityczna pozwala uzyskać odzysk herbicydów w przedziale 70-120%. Tylko w nielicznych przypadkach uzyskano odzysk nieco poza akceptowalnym zakresem.

W celu oszacowania precyzji metod wyznaczono współczynniki zmienności (CV) dla trzech serii próbek wzbogaconych mieszaninami badanych herbicydów na trzech różnych poziomach stężeń. Wyznaczono także precyzję pośrednią, co pozwoliło na określenie długoterminowego odchylenia procesu pomiarowego. Wielkość precyzji pośredniej wyrażono jako całkowity współczynnik zmienności dla wszystkich wyników uzyskanych na podstawie analiz prowadzonych przez pięć kolejnych dni. Uzyskane współczynniki zmienności z reguły nie przekraczały wartości 20%. Jednocześnie obserwowano wyższe wartości CV przy niższych stężeniach badanych herbicydów.

Liniowość opracowanych metod wyznaczono w oparciu o krzywe kalibracyjne w rozpuszczalniku z zastosowaniem wzorca wewnętrznego, w zakresach stężeń odpowiadających zawartości pozostałości herbicydów w próbkach rzeczywistych. Zakresy liniowości oznaczanych związków wraz ze współczynnikami korelacji ( $R^2$ ) zostały przedstawione w pracach **H1-H7**. Wysokie wartości liczbowe współczynników  $R^2$  wskazują na liniowość krzywych kalibracyjnych w badanych zakresach stężeń.

Granice wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ) wyznaczono w określonym zakresie liniowości metody dla każdego badanego herbicydu. Zastosowanie



spektrometru mas na etapie oznaczeń końcowych pozwoliło na osiągnięcie granic oznaczalności herbicydów na poziomie znacznie poniżej najwyższych dopuszczalnych poziomów (NDP) (**H1-H7**). Analizując otrzymane wyniki zaobserwowano nieznaczne różnice w niektórych wartościach LOD oraz LOQ otrzymanych dla tych samych związków. Różnice te potwierdzają, iż pojęcie granicy wykrywalności związane jest ściśle z określoną procedurą analityczną, a wartości liczbowe LOQ oraz LOD zależą nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego składnika, ale również od obecności innych składników występujących w badanej próbce.

W opisanych w pracach **H1-H7** procedurach analitycznych opartych o wykorzystanie techniki LC-MS/MS do analizy próbek biologicznych i środowiskowych charakteryzujących się złożonym składem matrycy, bardzo istotnym aspektem walidacji było wyznaczenie efektu matrycy. W badaniach opisanych w powyższych pracach efekt matrycowy powodował jedynie niewielkie osłabienie lub wzmocnienie sygnałów, pochodzących od badanych związków, a jego wartość w zdecydowanej większości mieściła się akceptowalnym zakresie -20-20%.

Opracowane i kompleksowo zwalidowane metody zostały sprawdzone w badaniach biegłości zorganizowanych m.in. przez unijne Laboratoria Referencyjne, w których uczestniczy ponad sto laboratoriów z całego świata. Uzyskane satysfakcjonujące wyniki świadczą o wiarygodności opracowanych metod. Zarówno poprawne wyniki walidacji, jak i badań biegłości były podstawą do akredytacji metod zgodnie z normą PN-ISO 17025 i włączenia ich do programu badań monitoringowych realizowanych przez zespół habilitanta.

Metoda oparta o opisaną strategię „one-step” wykorzystująca chitynę jako czynnik oczyszczający (**H1, H2**) umożliwiła przeprowadzenie kompleksowych studiów nad zanikaniem mesotrionu w roślinach kukurydzy i glebie, a także nad określeniem jego wpływu na aktywność enzymów glebowych (**H3**). Z przeprowadzonych badań wynika, że zanikanie mezotrionu zarówno w roślinach, jak i glebie przebiega zgodnie z równaniem kinetycznym pierwszego rzędu i zależy od właściwości fizykochemicznych gleby (składu granulometrycznego, zawartości substancji organicznej, makroelementów i pH). Nie zależy natomiast od zastosowanej dawki. Zaobserwowano szczególnie silną zależność pomiędzy pH, a szybkością degradacji mezotrionu w glebie. Czas, po upływie którego 50% ( $DT_{50}$ ) substancji uległo degradacji, był różny dla roślin i gleb.

W oparciu o opracowaną w pracy **H4** metodę przeprowadzono badania dwudziestu siedmiu próbek ryb złowionych na terenie Biebrzańskiego Parku Narodowego (**H4**). Oprócz obecności insektycydów chloroorganicznych (w 17 próbkach spośród 27), w dwóch przypadkach stwierdzono obecność atrazyny, herbicydu triazynowago, której stosowanie w UE jest zabronione od 2005 roku, oraz S-metolachloru (również w dwóch próbkach) - herbicydu z grupy chloroacetoanilidów stosowanego dogłębowo lub nalistnie, przeznaczonego do przed- i powschodowego zwalczania chwastów jednoliściennych oraz dwuliściennych w kukurydzy.

W pełni zwalidowaną, opisaną w pracy **H6** metodę analizy pozostałości kwaśnych herbicydów wykorzystano do analizy prawie 400 próbek gleby z różnych regionów rolniczych Polski. W szczególności metoda ta znalazła szerokie zastosowanie w identyfikowaniu szkód herbicydowych spowodowanych w głównej mierze zniesieniem cieczy roboczej na sąsiednie uprawy, a także identyfikowaniu nieprawidłowości w stosowaniu środków ochrony roślin w rolnictwie ekologicznym (**H6**).

Warto podkreślić, że opisana w pracy **H7** metodyka jest pierwszą opublikowaną procedurę oznaczania tak szerokiego zakresu silnie polarnych herbicydów na poziomie 0,01 mg/kg w jednym toku analitycznym (**H7**). Ważnym osiągnięciem było potwierdzenie obecności pozostałości glifosatu w 18% próbek rzepaku badanych w ramach zadania 1.7." Analiza pozostałości środków ochrony roślin i mikotoksyn w płodach rolnych pochodzących z produkcji pierwotnej oraz w wodach podziemnych i powierzchniowych w pobliżu miejsc produkcji" programu wieloletniego pod nazwą „Ochrona roślin uprawnych z uwzględnieniem bezpieczeństwa żywności oraz ograniczenia strat w plonach i zagrożeń dla zdrowia ludzi, zwierząt domowych i środowiska” realizowanego przez Instytut Ochrony Roślin – PIB na rzecz Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi.

*Przedstawiony cykl publikacji (H1-H7) stanowi kompleksowe opracowanie procedur przygotowania próbek roślinnych i środowiskowych oraz oznaczania w nich pozostałości herbicydów. Otrzymane wyniki badań opisane w pracach tworzących monotematyczny cykl publikacji pozwalają na następujące podsumowanie osiągnięcia naukowego:*

- Opracowano selektywne i efektywne metody oznaczania herbicydów o zróżnicowanych właściwościach fizyko-chemicznych w złożonych próbach roślinnych i środowiskowych.*
- Wprowadzone rozwiązania uprościły złożone i czasochłonne postępowanie analityczne, co znacząco skróciło czas analizy i obniżyło jej koszty.*
- Opracowane metody pozwalają na oznaczanie herbicydów na bardzo niskich stężeniach znacznie poniżej najwyższych dopuszczalnych poziomów.*
- Wyniki walidacji opracowanych metod analitycznych dowodzą, że można je zakwalifikować jako spełniające wymogi stawiane oznaczeniom jakościowym i ilościowym.*
- Wyniki przeprowadzonych badań mają istotne znaczenie w zapewnieniu bezpieczeństwa żywności i pasz oraz oceny stanu zanieczyszczenia środowiska rolniczego.*

**Literatura:**

- Anagnostopoulos C., Miliadis G.E. 2013. Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives. *Talanta* 112: 1–10.
- Anastassiades M., Lehotay S.J., Stajnbaher D., Schenck F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solidphase extraction for the determination of pesticide residues in produce. *J. AOAC Int.* 86: 412–431.
- Arias A.C.R., Palacio J.L., Chaparro-Giraldo A., López-Pazos S.A. 2017. Patents and genetically modified soybean for glyphosate resistance. *World Patent Information* 48: 47–51.
- Bakircia G.T., Acana D.B.Y., Bakircia F., Otleş S. 2014. Pesticide residues in fruits and vegetables from the Aegean region, Turkey. *Food Chem.* 160: 379–392.
- Ballesteros E., Garcia-Sanchez A., Ramos-Martos N. 2006. Simultaneous multidetermination of residues of pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in olive and olive-pomace oils by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1111: 89–96.
- Benbrook C.M. 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental Sciences Europe* 28: 3.
- Brown H.M. 1990. Mode of action, crop selectivity, and soil relations of the sulfonylurea herbicides. *Pestic. Sci.* 29: 263–281.
- Calderon M.J., De Luna E., Gomez J.A., Hermosin M.C. 2016. Herbicide monitoring in soil, runoff waters and sediments in an olive orchard. *Sci. Total Environ.* 569–570: 416–422.
- Carles L., Joly M., Bonnemoy F., Lereboure M., Batisson I., Besse-Hoggana P. 2017. Identification of sulfonylurea biodegradation pathways enabled by a novel nicosulfuron-transforming strain *Pseudomonas fluorescens* SG-1: Toxicity assessment and effect of formulation. *J. Hazard. Mater.* 324: 184–193.
- Chang C., Chen M., Gao J., Luo J., Wu K., Dong T., et al. 2017. Current pesticide profiles in blood serum of adults in Jiangsu Province of China and a comparison with other countries. *Environ. Int.* 102: 213–222.
- Chang G.R., Chen H.S., Lin F.L. 2016. Analysis of banned veterinary drugs and herbicide residues in shellfish by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and gas chromatography–tandem mass spectrometry (GC/MS/MS). *Mar. Pollut. Bull.* 113: 579–584.
- Chao J.B., Liu J.F., Wen M.J., Liu J.M., Cai Y.Q., Jiag G.B. 2002. Determination of sulfonylurea herbicides by continuous-flow liquid membrane extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 955: 183–189.
- Conrad A., Schroter-Kermani C., Hoppe H.W., Ruther M., Pieper S., Kolossa-Gehring M. 2017. Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 220: 8–16.

- Conrad A., Schroter-Kermani C., Hoppe H.W., Ruther M., Pieper S., Kolossa-Gehring M. 2017. Glyphosate in German adults – Time trend (2001 to 2015) of human exposure to a widely used herbicide. *Int. J. Hyg. Envir. Heal.* 220: 8–16.
- Crespo-Corral E., Santos-Delgado M.J., Polo-Diez L.M., Soria A.C. 2008. Determination of carbamate, phenylurea and phenoxy acid herbicide residues by gas chromatography after potassium *tert*-butoxide/dimethyl sulphoxide/ethyl iodide derivatization reaction. *J. Chromatogr. A* 1209: 22–28.
- Cserhati T., Forgacs E. 1998. Phenoxyacetic acids: separation and quantitative determination. *J. Chromatogr. B* 717: 157–178.
- Czerniakowski Z., Czerniakowski Z.W., 1993. *Herbicydy. Skrypty dla Szkół Wyższych*, AR Kraków.
- Devault D.A., Gérino M., Laplanche C., Julien F., Winterton P., Merlina G., et al. 2009. Herbicide accumulation and evolution in reservoir sediments. *Sci. Total Environ.* 407: 2659–2665.
- Dmochowska H. 2013. *Rocznik statystyczny Rzeczypospolitej Polskiej. Zakład Wydawnictw Statystycznych. Warszawa*
- European Union 2004. Regulation No 882/2004 of the European Parliament and of the council of 29 April 2004 on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules.
- European Union 2005. European Commission Regulation NO 396/2005 of the European Parliament and of the council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC.
- European Union 2012. Commission Implementing Regulation No 788/2012 of 31 August 2012 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2013, 2014 and 2015 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin.
- European Union 2014. Commission Implementing Regulation No 400/2014 of 22 April 2014 concerning a coordinated multiannual control programme of the Union for 2015, 2016 and 2017 to ensure compliance with maximum residue levels of pesticides and to assess the consumer exposure to pesticide residues in and on food of plant and animal origin.
- EUROSTAT, 2016. Agri-environmental indicator – consumption of pesticides. Available online: [http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental\\_indicator\\_-\\_consumption\\_of\\_pesticides](http://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides) (Accessed: July, 2016).
- Ferrer C., Gomez M.J., Garcia-Reyes J.F., Ferrer I., Thurman E.M., Fernandez-Alba A.R. 2005. Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1069: 183–194.
- Ferrer C., Lozano A., Aguera A., Giron A.J., Fernandez-Alba A.R. 2011. Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1218: 7634–7639.
- Gallitzendorfer R., Timm T., Koch D., Kusters M., Gerhartz M. 2011. Simultaneous determination of 12 sulfonylurea herbicides in drinking water after SPE by LC-DAD. *Chromatographia* 73: 813–816.

- García-Reyes J., Hernando M., Ferrer C., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R. 2007. Large scale pesticide multiresidue methods in food combining liquid chromatography – time-of-flight mass spectrometry and tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 79: 7308–7323.
- Ghobadi M., Yamini Y., Ebrahimpour B. 2015. Extraction and determination of sulfonylurea herbicides in water and soil samples by using ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction and analysis by high-performance liquid chromatography. *Ecotox. Environ. Safe.* 112: 68–73.
- Gilbert-Lopez B., Garcia-Reyes J.F., Fernandez-Alba A.R., Molina-Diaz A. 2010. Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1217: 3736–3747.
- Golombieski J.I., Jonas Sutili F., Salbego J., Seben D., Tourem Gressler L., Arrudada Cunha J., et al. 2016. Imazapyr + imazapic herbicide determines acute toxicity in silver catfish *Rhamdia quelen*. *Ecotox. Environ. Safe.* 128: 91–99.
- Granados-Galván I.A., Rodríguez-Meza D.G., Luna-González A., González-Ocampo H.A., 2015. Human health risk assessment of pesticide residues in snappers (*Lutjanus*) fish from the Navachiste Lagoon complex, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 97: 178–187.
- Greek J.M., Owen M.D.K. 2011. Herbicide-Resistant Crops: Utilities and Limitations for Herbicide-Resistant Weed Management. *J. Agr. Food Chem.* 59: 5819–5829.
- Grekul C.W., Cole D.E., Bork E.W. 2005. Canada thistle (*Cirsium arvense*) and pasture forage responses to wiping with various herbicides. *Weed Technol.* 19: 298–306.
- Guan W., Li Z., Zhang H., Hong H., Rebeyev N., Ye Y., et al. 2013. Amine modified graphene as reversed-dispersive solid phase extraction materials combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for pesticide multi-residue analysis in oil crops. *J. Chromatogr. A* 1286: 1– 8.
- Hakme E., Lozano A., Gómez-Ramos M.M., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. 2017. Non-target evaluation of contaminants in honey bees and pollen samples by gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Chemosphere* 184: 1310–1319.
- Hang B.J., Hong Q., Xie X.T., Huang X., Wang C.H., He J., et al. 2012. SulE, a sulfonylurea herbicide de-esterification esterase from *Hansschlegelia zihuaiae* S113. *Appl. Environ. Microb.* 78: 1962–1968.
- Hasenbein S., Peralta J., Lawler S.P., Connona R.E. 2017. Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. *Sci. Total Environ.* 607–608: 733–743.
- Herrero-Hernández E., Rodríguez-Cruz M.S., Pose-Juan E., Sánchez-González S., Soledad Andrades M., Sánchez-Martín M.J. 2017. Seasonal distribution of herbicide and insecticide residues in the water resources of the vineyard region of La Rioja (Spain). *Sci. Total Environ.* 609: 161–171.
- Hladik M.L., Bouwer E.J., Roberts A.L. 2008. Neutral degradates of chloroacetamide herbicides: Occurrence in drinking water and removal during conventional water treatment. *Water Res.* 42: 4905–4914.
- HRAC (Herbicide Resistance Action Committee), 2017. [www.hracglobal.com](http://www.hracglobal.com) (Accessed: 10.10.2017).
- Hua K., Xiaogang C., Yuxia H., Chuanlai X. 2006. Simultaneous Determination of 13 Phenoxy Acid Herbicide Residues in Soybean by GC-ECD. *Anal. Lett.* 39: 2617–2627.

- Jiang Y., Li Y., Jiang Y., Li J., Pan C. 2012. Determination of multiresidues in rapeseed, rapeseed oil, and rapeseed meal by acetonitrile extraction, low-temperature cleanup, and detection by liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Agr. Food Chem.* 60: 5089–5098.
- Kamata M., Asami M., Matsui Y. 2017. Presence of the  $\beta$ -triketone herbicide tefuryltrione in drinking water sources and its degradation product in drinking waters. *Chemosphere* 178: 333–339.
- Kiljanek T., Niewiadowska A., Semeniuk S., Gawęł M., Borzęcka M., Posyński A. 2015. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry –Honeybee poisoning incidents. *J. Chromatogr. A* 1435: 100–114.
- Koesukwiwat U., Sanguankaew K., Leepipatpiboon N. 2008. Rapid determination of phenoxy acid residue in rice by modified QuEChERS extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 626: 10–20.
- Kolberg D.I.S., Mack D., Anastassiades M., Hetmanski M.T., Fussell R.J., Meijer T., et al. 2012. Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses. *Anal. Bioanal. Chem.* 404: 2465–2474.
- Lacina O., Zachariasova M., Urbanova J., Vaclavikova M., Cajka T., Hajslova J. 2012. Critical assessment of extraction methods for the simultaneous determination of pesticide residues and mycotoxins in fruits, cereals, spices and oil seeds employing ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1262: 8–18.
- Lee Y.J., Rahman M.M., Abdel-Aty A.M., Choa J.H., Chung H.S., Kim S.W., et al. 2016. Detection of three herbicide, and one metabolite, residues in brown rice and rice straw using various versions of the QuEChERS method and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 210: 442–450.
- Leganà A., Fago G., Marino A. 1998. Determination of arylalkoxyphenoxypropionic acid herbicides in water using different solid-phase extraction procedure and liquid chromatography–diode array detection. *J. Chromatogr. A* 796: 309–318.
- Lehotay S.J., Son K.A., Kwon H., Koesukwiwat U., Fu W., Mastovska K., et al. 2010. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *J. Chromatogr. A* 1217: 2548–2560.
- Liu C., Dou X., Zhang L., Li Q., Qin J., Duan Y., et al. 2018. Determination of triazine herbicides and their metabolites in multiple medicinal parts of traditional Chinese medicines using streamlined pretreatment and UFLC–ESI–MS/MS. *Chemosphere* 190: 103–113.
- Lopez S.H., Lozano A., Sosa A., Hernando M.D., Fernández-Alba A.R. 2016. Screening of pesticide residues in honeybee wax comb by LC–ESI–MS/MS. A pilot study. *Chemosphere* 163: 44–53.
- Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., Hrynko I., Kaczyński P. 2016. Toxicological evaluation of multi-class pesticide residues in vegetables and associated human health risk study for adults and children. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22: 1480–1505.
- Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., Kaczyński P. 2009. Comparison of two preparation procedures for determination of pesticides residues in oilseed rape by gas chromatography. *Chemical Analysis* 54: 367–387.



- Łozowicka B., Rutkowska E., Jankowska M., Kaczyński P., Hrynko I. 2012. Health risk analysis of pesticide residues in berry fruit from north-eastern Poland. *J. Fruit Ornament. Plant Res.* 20: 83–95.
- Main K.M., Skakkebaek N.E., Virtanen H.E., Toppari J. 2010. Genital anomalies in boys and the environment. *Best. Pract. Res. Clin. En.* 24: 279–289.
- Matuszewski B.K., Constanzer M.L., Chavez-Eng C.M. 2003. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75: 3019–3030.
- McKinlay R., Plant J.A., Bell J.N., Voulvoulis N. 2008. Endocrin disrupting pesticides: Implications for risk assessment. *Environ. Int.* 34: 168–183.
- Mesnager R., Defarge N., Spiroux de Vendomois J., Seralini G. E. 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food Chem. Toxicol.*: 133–153.
- Mezcua M., Malato O., García-Reyes J., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R. 2009. Accurate-Mass Databases for Comprehensive Screening of Pesticide Residues in Food by Fast Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81: 913–929.
- Mol H.G.J., Plaza-Bolanos P., Zomer P., Rijk T.C., Stolker A.A.M., Mulder P.P.J. 2008. Toward a generic extraction method for simultaneous determination of pesticides, mycotoxins, plant toxins, and veterinary drugs in feed and food matrixes. *Anal. Chem.* 80: 9450–9459.
- Moreno-Gonzalez D., Huertas-Perez J.F., Garcia-Campana A.M., Gamiz-Gracia L. 2014. Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new clean-up based on zirconia for QuEChERS methodology. *Talanta* 128: 299–304.
- Oshita D., Jardim I.C.S.F. 2014. Comparison of Different Sorbents in the QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Strawberries by LC-MS/MS. *Chromatographia* 77: 1291–1298.
- Panseri S., Biondi P.A., Vigo D., Communod R., Chiesa L.M. 2013. Occurrence of organochlorine pesticides residues in animal feed and fatty bovine tissue. *Food Industry* 13: 261–283.
- Panten U., Schwanstecher M., Schwanstecher C. 1996. Sulfonylurea receptors and mechanism of sulfonylurea action. *Exp. Clin. Endocr. Diab.* 104: 1–9.
- Patel K., Fussell R.J., Hetmanski M., Goodall D.M., Keely B.J. 2005. Evaluation of gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry for the determination of organochlorine pesticides in fats and oils. *J. Chromatogr. A* 1068: 289–296.
- Piekarczyk M., Jaskulski D., 2016. Chwasty i ich zwalczanie – element polowej produkcji roślinnej. Wydawnictwo Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego w Bydgoszczy.
- Popp J., Petó K., Nagy J.. 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 33: 243–255.
- Poulsen M.E., Andersen J.H., Petersen A., Jensen B.H. 2017. Results from the Danish monitoring programme for pesticide residues from the period 2004–2011. *Food Control* 74: 25–33.
- Praczyk T., Skrzypczak G. 2004. *Herbicydy*, Państwowe Wydawnictwo Rolnicze i Leśne, Poznań.
- Qian K., Tang T., Shi T., Li P., Li J., Cao Y. 2009. Solid-phase extraction and residue determination of glyphosate in apple by ion-pairing reverse-phase liquid chromatography with pre-column derivatization. *J Sep. Sci.* 32: 2394–2400.



- Reindl A.R., Falkowska L., Grajewska A. 2015. Chlorinated herbicides in fish, birds and mammals in the Baltic Sea. *Water Air Soil Poll.* 226: 276.
- Remane D., Meyer M.R., Wissenbach D.K., Maurer H.H. 2010. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. *Rapid Commun. Mass Sp.* 24: 3103–3108.
- Robinson T., Ali U., Mahmood A., Chaudhry M.J.I., Li J., Zhang G., et al. 2016. Concentrations and patterns of organochlorines (OCs) in various fish species from the Indus River, Pakistan: A human health risk assessment. *Sci. Total Environ.* 541: 1232–1242.
- Romano M.A., Romano R.M., Santos L.D., Wisniewski P., Campos D.A., de Souza P.B., et al. 2012. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. *Arch. Toxicol.* 86: 663–673.
- SANCO, 2014. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/12571/2013. European Commission Directorate-General For Health And Food Safety.
- SANTE, 2016. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. Document No. SANTE 11945/2015. European Commission Directorate-General For Health And Food Safety.
- Santos M.S.F., Schaule G., Alves A., Madeira L.M. 2013. Adsorption of paraquat herbicide on deposits from drinking water networks. *Chem. Eng. J.* 229: 324–333.
- Santos-Delgado M.J., Crespo-Corral E., Polo-Diez L.M. 2000. Determination of herbicides in soil samples by gas chromatography: optimization by the simplex method. *Talanta* 53: 367–377.
- Scherr K., Bielská L., Kosubová P., Dinisová P., Hvězdová M., Šimek Z., et al. 2017. Occurrence of Chlorotriazine herbicides and their transformation products in arable soils. *Environ. Pollut.* 222: 283–293.
- Schütte G., Eckerstorfer M., Rastelli V., Reichenbecher W., Restrepo-Vassalli S., Ruohonen-Lehto M., et al. 2017. Herbicide resistance and biodiversity: agronomic and environmental aspects of genetically modified herbicide-resistant plants. *Environ. Sci. Eur.* 29: 5.
- Silva V., Montanarell L., Jones A., Fernández-Ugald O., Mol H.G.J., Ritsema C.J., et al. 2017. Distribution of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) in agricultural topsoils of the European Union. *Sci. Total Environ.* 621: 1352–1359.
- Skiff W., Orlikowska A., Schulz-Bull D.E. 2017. Methods comparison, transport and distribution of polar herbicides in the Baltic Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 114: 1110–1117.
- Steinborn A., Alder L., Michalski B., Zomer P., Bendig P., Aleson Martinez S., et al. 2016. Determination of Glyphosate Levels in Breast Milk Samples from Germany by LC-MS/MS and GC-MS/MS. *J. Agr. Food Chem.* 64: 1414–1421.
- Stephenson C.L., Harris C.A. 2016. An assessment of dietary exposure to glyphosate using refined deterministic and probabilistic methods. *Food Chem. Toxicol.* 95: 8–41.

- Stipičević S., Galzina N., Udiković-Kolić N., Jurina T., Mendaš G., Dvorščak M., et al. 2015. Distribution of terbuthylazine and atrazine residues in crop-cultivated soil: The effect of herbicide application rate on herbicide persistence. *Geoderma* 259–260: 300–309.
- Szpyrka E., Kurdziel A., Matyaszek A., Podbielska M., Rupař J., Słowik-Borowiec M. 2015. Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from the region of south-eastern Poland. *Food Control* 48: 137–142.
- Taha S.M., Gadalla S.A. 2017. Development of an efficient method for multi residue analysis of 160 pesticides in herbal plant by ethyl acetate hexane mixture with direct injection to GC-MS/MS. *Talanta* 174: 767–779.
- Tao B., Shao B.H., Qiao Y.X., Wang X.Q., Chang S.J., Qiu L.J. 2017. Identification and functional analysis of a new glyphosate resistance gene from a fungus cDNA library. *Pestic. Biochem. Phys.* 140: 65–68.
- Townsend M., Peck C., Meng W., Heaton M., Robison R., O'Neill K. 2017. Evaluation of various glyphosate concentrations on DNA damage in human Raji cells and its impact on cytotoxicity. *Regul. Toxicol. Pharm.* 85: 79–85.
- Walorczyk S. 2008. Development of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography-tandem quadrupole mass spectrometry II. Improvement and extension to new analytes. *J. Chromatogr. A* 1208: 202–214.
- Wang D., Yu Y., Zhang X., Zhang D., Zhang S., Wu M., 2013. Organochlorine pesticides in fish from Taihu Lake, China, and associated human health risk assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 98: 383–389.
- Wang K.C., Chen S.M., Hsu J.F., Cheng S.G., Lee C.K. 2008. Simultaneous detection and quantitation of highly water-soluble herbicides in serum using ion-pair liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 876: 211–218.
- Wine O., Osornio-Vargas A.R., Buka I.S., 2012. Fish consumption by children in Canada: Review of evidence, challenges and future goals. *Paediatr. Child Health* 17: 241–245.
- Wu X., Zhang R., Liu X., Guan W., Liu X., Wang Z., et al. 2015. Evaluation of graphene for effective cleanup of fruit and vegetable extracts in pesticide residue analysis. *Food Anal. Method.* 8: 243–253.
- Yannicari M., Istilart C., Giménez D.O., Castro A.M. 2015. Inheritance of glyphosate resistance in *Lolium perenne* and hybrids with *Lolium multiflorum*. *Crop Prot.* 71: 72–78.
- Yohannes Y.B., Ikenaka Y., Saengtienchai A., Watanabe K.P., Nakayama S.M.M., Ishizuka M., 2014. Concentrations and human health risk assessment of organochlorine pesticides in edible fish species from a Rift Valley lake – Lake Ziway, Ethiopia. *Ecotox. Environ. Safe.* 106: 95–101.
- Zhou Q., Wang W., Xiao J. 2006. Preconcentration and determination of nicosulfuron, thifensulfuron-methyl and metsulfuron-methyl in water samples using carbon nanotubes packed cartridge in combination with high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 559: 200–206.
- Zouaoui K., Dulaurent S., Gaulier J.M., Moesch C., Lachâtre G. 2013. Determination of glyphosate and AMPA in blood and urine from humans: About 13 cases of acute intoxication. *Forensic Sci. Int.* 226: e20–e25.



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

W 2005 roku ukończyłem studia na Wydziale Biologiczno-Chemicznym Uniwersytetu w Białymstoku uzyskując tytuł magistra chemii na podstawie pracy „*Badanie zależności między strukturą a aktywnością biologiczną związków o działaniu hipolimenicznym*” wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Bożeny Łozowickiej.

Pracę w Instytucie Ochrony Roślin – Państwowym Instytucie Badawczym, Terenowej Stacji Doświadczalnej w Białymstoku rozpocząłem 2 stycznia 2006 roku na stanowisku inżyniera, wchodząc w skład zespołu Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin.

Od początku zatrudnienia intensywnie uczestniczyłem w przygotowaniu Laboratorium, wypełniającego zadania kontroli urzędowej poprzez badania analityczne pozostałości środków ochrony roślin w materiale roślinnym, do akredytacji wg normy PN-EN ISO/IEC 17025:2005. W tym celu odbyłem szereg szkoleń i pozyskałem uprawnienia audytora wewnętrznego. Już 5 stycznia 2006 powierzono mi funkcję kierownika ds. technicznych w Systemie Zarządzania. Przygotowałam lub współtworzyłem wiele dokumentów systemowych: księgę jakości, instrukcje techniczne, procedury ogólne oraz stosowane w Laboratorium procedury badawcze. Działania, w których brałem aktywny udział zaowocowały uzyskaniem przez Laboratorium Badania Pozostałości Środków Ochrony Roślin uzyskaniem akredytacji Polskiego Centrum Akredytacji.

Główna tematyka mojej pracy badawczej ściśle wynika ze specyfiki działalności jednostki w której jestem zatrudniony i koncentruje się przede wszystkim na bezpieczeństwie żywności i środowiska rolniczego, ocenie jakości płodów rolnych pod kątem ich zanieczyszczenia pozostałościami środków ochrony roślin, szacowania związanego z nimi ryzyka narażenia konsumentów. Zrealizowane w tym obszarze badania pozwoliły na opracowanie modelu występowania pozostałości środków ochrony roślin w płodach rolnych w zależności od badanych grup roślin i wykrywanych substancji czynnych pestycydów. Ponadto, uzyskane wyniki wskazują na nasilenie niekorzystnych trendów, takich jak: wysoka wykrywalność przekroczeń limitów granicznych pozostałości w płodach rolnych; stosowanie preparatów niezalecanych i substancji zabronionych w uprawach, w szczególności małoobszarowych; wzrastającego odsetka próbek z multipozostałościami, co w aspekcie bezpieczeństwa żywności niesie z sobą wyższe zagrożenie zdrowia konsumentów. Wykazują również na związek zmian

zanieczyszczenia pozostałościami żywności pochodzenia roślinnego na etapie produkcji pierwotnej w zależności od miejsca i sposobu produkcji (*Zał. 4. II.A.1, 11; II.D.a.3, 4, 7, 9, 10, 17, 20, 22, 26, 28, 30, 32, 35, 36, 42; II.D.c.5*).

Uzyskane wyniki badań pozostałości środków ochrony roślin stanowiły podstawę do oceny związanego z nimi ryzyka dla konsumentów. Ażeby ocenić tego rodzaju ryzyko oszacowałem dietetyczne pobranie, stosując właściwe modele statystyczne. W badaniach, jako narzędzie do szacowania narażenia wykorzystałem dwa deterministyczne modele: narażenia chronicznego (długoterminowego), odnoszącego się do całego życia i narażenia ostrego (krótkoterminowego), związanego z jednorazowym lub jednodniowym pobraniem. Decydujący wpływ na narażenie mały poziomy pozostałości oraz wielkość spożycia poszczególnych produktów. Z przeprowadzonych badań wynika, że pozostałości środków ochrony roślin są najczęściej wykrywane w owocach i warzywach, rzadziej w zbożach (*Zał. 4. II.A.4, 8, 11, 12, 16; II.D.a.2, 8, 9, 14, 16, 17, 22, 27, 40, 42; II.D.b.3, 4*). Owoce i warzywa często są spożywane na surowo, czyli z pominięciem etapu przetwarzania, który może przyczynić się do znaczącego obniżenia poziomów pozostałości środków ochrony roślin, a ponadto mają duży udział w diecie. Drugi podstawowy parametr w ocenie narażenia stanowiły toksykologiczne dawki odniesienia. Toksykologiczna dawka odniesienia jest ilością substancji, która może być spożywana bez znaczącego ryzyka dla zdrowia ludzi. Istnieją dwie dawki odniesienia – dopuszczalne dzienne pobranie (ADI) i ostra dawka referencyjna (ARfD) – w badaniach toksyczności wywołanej w krótkim czasie. Obie dawki wyrażone są w mg/kg masy ciała. Dla danego pestycydu pobranie wyrażane jest najczęściej jako procent dawki odniesienia i jest ono akceptowalne jeśli nie przekracza 100%. Zważywszy na powyższe czynniki wpływające na ryzyko związane z obecnością pozostałości w spożywanej żywności, oceniając ryzyko uwzględniłem odmienne zwyczaje żywieniowe poszczególnych grup konsumentów (np. małe dzieci, dorośli, wegetarianie).

Na podstawie prowadzonych badań oceniłem, że narażenie przewlekłe konsumentów na pozostałości środków ochrony roślin zawartych w polskich płodach rolnych z północno – wschodniej Polski, nie powinno powodować skutków zdrowotnych i osiąga maksymalnie dla dorosłych kilka procent, a w przypadku małych dzieci do kilkudziesięciu procent bezpiecznej wielkości ADI. Tylko w nielicznych przypadkach,

oszacowane dla małych dzieci narażenie krótkoterminowe nieznacznie przekracza bezpieczną wartość ARfD (*Zał. 4. II.A.3, 4, 11, 12, 17, 20, 21; II.D.a.12, 23, 24, 33, 38, 41*).

Równoległe do opisanych powyżej badań rozwijałem swoje zainteresowania naukowe w obszarze poszukiwania nowych substancji czynnych o potencjalnym działaniu deterentnym wobec owadów szkodników produktów magazynowych i roślin uprawnych. W tym kontekście dostrzegłem szerokie możliwości wykorzystania wiedzy zdobytej w trakcie realizacji pracy magisterskiej na nowych obszarach. Innowacyjne podejście wynikało z przeniesienia na grunt chemii pestycydów strategii wykorzystanej w projektowaniu leków, polegającej na poszukiwaniu nowych związków o działaniu przewidzianym na podstawie racjonalnych przesłanek opartych o wyniki modelowania molekularnego.

W wyniku prowadzonych prac otrzymano szereg nowych związków dla których określono aktywność deterentną wobec chrząszczy wołka zbożowego (*Sitophilus granarius* L.), larw skórka zbożowego (*Trogoderma granarium* Ev.) oraz larw i chrząszczy trojszyka ulca (*Tribolium confusum* Duv.) pochodzących z własnej hodowli, a także larw i chrząszczy stonki ziemniaczanej. Do opisu aktywności deterentnej wykorzystałem szereg deskryptorów fizykochemicznych, opisujących trójwymiarową budowę cząsteczki, obliczonych za pomocą metod modelowania molekularnego oraz chromatograficzne parametry lipofilowości wyznaczone poprzez wysokosprawną chromatografię cieczową w odwróconym układzie faz. Do poznania mechanizmu działania antyfidantnego zastosowałem strategię polegającą na badaniu zbioru ligandów o znanej aktywności deterentnej. Do ustalenia zależności pomiędzy trójwymiarową budową cząsteczek, a ich aktywnością (QSAR) zastosowano porównawczą analizę powierzchni cząsteczkowej s-CoMSA oraz SOM-CoMSA oraz analizę powierzchni receptora. Prace te przeprowadzono wspólnie z dr Tomaszem Magdziarzem z Uniwersytetu Śląskiego. Badania te doprowadziły do uzyskania wiarygodnego modelu wiążącego aktywność biologiczną, parametry chromatograficzne ze strukturą chemiczną związków, który pozwala ukierunkowani syntezy kolejnych analogów tak aby uzyskać pochodne o jak najlepszych właściwościach deterentnych.

W realizacji tych badań dużą rolę odegrał grant badawczy przyznany przez Narodowe Centrum Nauki, kierowany przez prof. dr hab. Bożenę Łozowicką (NN310781940), którego byłem wykonawcą. Uzyskane wyniki badań były przedmiotem mojej rozprawy doktorskiej zatytułowanej „*Nowe deterenty pokarmowe – biologiczna*

*aktywność wobec szkodników magazynowych w ujęciu modelowania molekularnego” oraz trzech patentów (Zał. 4. II.B.1, 2, 3), pięciu publikacji (Zał. 4. II.A.6, 7, 8; II.D.a.1; II.D.c.2, 3), a także sześciu wystąpień ustnych i prezentacji posterowych (Zał. 4. II.K.5; III.B.a.4, 6, 7, 8; III.B.b.34).*

W latach 2012–2014 uczestniczyłam w przygotowaniu i realizacji dużego projektu rozwojowego finansowanego ze środków strukturalnych UE POIG (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka) „Laboratoria do badań pestycydów z uwzględnieniem bezpieczeństwa żywności - LAPESTY”. Kwota ponad 6,5 mln złotych została przeznaczona na modernizację Laboratorium i doposażenie go w nowoczesną aparaturę. Pozyskanie unikalnej aparatury GC-MS/MS czy LC-MS/MS przyczyniło się do podjęcia nowych kierunków badań naukowych i ich rozszerzenia.

Po doktoracie zaangażowałam się w badania nad wpływem procesów technologicznych na zmiany stężeń pozostałości pestycydów w surowcach roślinnych. Odbyłem trzymiesięczny staż w przedsiębiorstwie zajmującym się przetwórstwem owoców i warzyw, a zdobyte doświadczenie było pomocne w organizacji pracy analitycznej oraz w projektowaniu zadań badawczych.

W efekcie prowadzonych w tym obszarze badań oceniłem wpływ procesów technologicznych z zastosowaniem wody (mycie wodą chlorowaną, ozonowaną oraz przy pomocy ultradźwięków), czynnika mechanicznego (wyciskanie soku, usunięcie skórki, homogenizacja) oraz czynnika termicznego (gotowanie, blanszowanie, pasteryzacja) na stężenia pozostałości środków ochrony roślin obecnych w owocach i warzywach. Uzyskane wyniki dowiodły, że zastosowanie wybranych procesów technologicznych znacząco wpłynęło na redukcję stężenia pestycydów, z pewnymi wyjątkami. Najbardziej efektywne zredukowanie stężeń substancji czynnych uzyskano w procesach opartych na wykorzystaniu wysokiej temperatury. W celu odzwierciedlenia zmienności skutków przetwarzania na poziom pozostałości pestycydów określiłem zależności między efektywnością procesu technologicznego, a właściwościami fizykochemicznymi substancji czynnych i mechanizmem ich działania. Na podstawie wielowymiarowych analiz statystycznych wykazałem, iż kluczowymi parametrami mającymi wpływ na zmianę poziomu pozostałości jest polarność, rozpuszczalność oraz mechanizm penetracji substancji czynnej. Najbardziej podatne na eliminację w trakcie przetwarzania są pestycydy o działaniu powierzchniowym, wykazujące wysoką polarność oraz dobrą rozpuszczalność w wodzie.



Efektem tych badań były liczne publikacje (*Zał. 4. II.A.14, 18, 19; II.C.c.4, 6*) oraz rozprawa doktorska dr Magdaleny Jankowskiej „*Wpływ procesów technologicznych na pozostałości środków ochrony roślin w wybranych gatunkach owoców i warzyw*” obronionej 8 czerwca 2016, której byłem promotorem pomocniczym. Prowadzone badania w dużej mierze zostały sfinansowane z grantu NCN (2012/07/N/NZ9/00043, Preludium 4) „*Ocena ryzyka narażenia zdrowia konsumentów na pozostałości pestycydów w żywności poddanej obróbce technologicznej*”, którego byłem wykonawcą.

Realizowane przeze mnie tematyka badawcza obejmuje również studia nad występowaniem i wpływem pozostałości środków ochrony roślin na owady zapylające. Zatrucia pszczół stanowią podstawowy sygnał alarmujący o negatywnych skutkach stosowania środków ochrony roślin. Monitoring zatruć pszczół jest narzędziem pozwalającym na praktyczną weryfikację procesu oceny ryzyka stosowania środków ochrony roślin dla tych owadów oraz oceny poprawności zaleceń dotyczących ich stosowania (*Zał. 4. II.A.22; II.D.b.6, 7; II.D.c.7*). Ponadto, w dotychczasowych dyskusjach na temat ochrony owadów zapylających temat obecności insektycydów w kwiatostanach roślin miododajnych występujących w środowisku naturalnym był ignorowany i niedoceniony. Uwaga pszczelarzy, naukowców i organizacji działających na rzecz ochrony środowiska skierowana była w stronę pozostałości insektycydów w pszczołach i produktach pszczelich. Jednak, jak wynika z najnowszych ustaleń ryzyko narażenia pszczół na obecność insektycydów w roślinach innych niż docelowe chronione chemicznie jest większe niż dotychczas szacowano. Tematyka ta stanowi przedmiot przygotowywanej rozprawy doktorskiej, której jestem promotorem pomocniczym (*Zał. 4. III.K.3*).

Zanieczyszczenie mikotoksynami zbóż jest jednym z ważniejszych problemów współczesnego rolnictwa. Biosynteza mikotoksyn uzależniona jest od czynników środowiskowych i może mieć miejsce podczas wegetacji roślin, w czasie zbiorów lub w trakcie przechowywania i przetwarzania surowców. Oddziaływanie wtórnych metabolitów pleśni na organizmy zwierzęce jest zróżnicowane. Przypisuje się działanie kancerogenne, mutagenne, teratogenne, estrogenne, krwotoczne i toksyczne dla układu krwiotwórczego, immunotoksyczne oraz hepatotoksyczne. Chociaż nie jest możliwe wyeliminowanie mikotoksyn z zasobów żywności i pasz, zastosowanie odpowiednich praktyk rolniczych, właściwe przechowywanie i kontrola produktów może obniżyć narażenie na te substancje. Z tego też względu, w ostatnim czasie prowadzę badania nad

rozwojem metod analitycznych oznaczania zawartości mikotoksyn oraz określeniem wpływu stosowanej ochrony roślin na występowanie i ich poziom w ziarnie zbóż (Załącznik 4. II.A.27).

Obecnie, obok tematyki realizowanej w ramach opisanego w niniejszym autoreferacie osiągnięcia naukowego, prowadzę badania nad zanikaniem pestycydów i ich metabolitów w roślinach uprawnych i środowisku (Załącznik 4. II.A.15, 18, 23, 24).

### Wybrane wskaźniki bibliometryczne dorobku publikacyjnego.

L.p.	Parametr	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
1.	Publikacje naukowe w czasopismach się w bazie Journal Citation Reports			
	• Liczba publikacji	5	30*	35*
	• Sumaryczny <i>Impact Factor</i>	5,117	77,642*	82,819*
	• Łączna liczba punktów wg listy MNiSW za publikacje z <i>Impact Factor</i>	95	870*	965*
2.	Patenty			
	• Liczba patentów	1	2	3
	• Łączna liczba punktów wg MNiSW za patenty	25	50	75
3.	Publikacje w innych recenzowanych czasopismach			
	• Liczba publikacji	28	15	43
	• Łączna liczba punktów wg listy MNiSW	132	135	267
4.	Monografie i rozdziały w monografiach			
	• Liczba publikacji	3	4	7
	• Łączna liczba punktów wg MNiSW	35	20	55
5.	Prace w recenzowanych wydawnictwach z konferencji i sympozjów naukowych	3	4	7
6.	Prace popularno-naukowe	0	3	3
7.	Doniesienia na konferencjach międzynarodowych	5	16	21
8.	Doniesienia na konferencjach krajowych	33	34	67
	<b>Łączna liczba punktów wg klasyfikacji MNiSW</b>	<b>287</b>	<b>1075</b>	<b>1362</b>

\* w tym 7 publikacji wchodzących w skład osiągnięcia stanowiącego podstawę postępowania habilitacyjnego (IF – 28,063; 260 pkt MNiSW).

15.05.2018 Piotr Kępczyński