

dr Piotr Jedziniak

Zakład Farmakologii i Toksykologii

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy

## **AUTOREFERAT**

*(załącznik 2 do postępowania habilitacyjnego)*

**Puławy, 2013**

## Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej .....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych.....	3
4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):.....	3
4a) tytuł osiągnięcia naukowego (jednotematyczny cykl publikacji).....	3
4b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:.....	3
4c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.....	4
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych .....	15
5a) pozostały dorobek publikacyjny.....	15
5b) Udział w projektach badawczych.....	20
5c) Udział w kursach i szkoleniach.....	20
5d) Nagrody i wyróżnienia.....	21
5e) Recenzje .....	21
5f) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach.....	21
5g) Działalność dydaktyczna.....	22
5h) Działalność organizacyjna.....	22

### 1. Imię i nazwisko

Piotr Jedziniak

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

**2007**            **doktor nauk weterynaryjnych** – Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, tytuł rozprawy: „Dobór metod oznaczania i badania nad występowaniem pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych w mleku krowim”

**2002**            **magister chemii**, specjalność: chemia fizyczna i teoretyczna - Uniwersytet Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie

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

**2008**            **adiunkt** - Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

**2007**            **główny specjalista badawczo-techniczny** - Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

**2002-2006**    **doktorant** -Zakład Farmakologii i Toksykologii, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy w Puławach

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

#### 4a) tytuł osiągnięcia naukowego (jednotematyczny cykl publikacji)

„Oznaczanie pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych w żywności pochodzenia zwierzęcego z wykorzystaniem tandemowej spektrometrii mas.”

#### 4b) wykaz publikacji wchodzących w skład cyklu:

**H-1: Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., Olejnik, M., & Zmudzki, J. (2010). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 672(1-2), 85–92. (IF = 4,55; liczba cytowań = 11)

*Wkład pracy habilitanta: 70 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku*

**H-2: Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., Pietruk, K., Sledzińska, E., & Zmudzki, J. (2012). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites in milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(10), 2955–63. (IF = 3,78; liczba cytowań = 2)

*Wkład pracy habilitanta: 80 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku*

**H-3: Olejnik, M., Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., & Zmudzki, J. (2013). Influence of matrix effect on the performance of the method for the official residue control of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal muscle. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 27(3), 437–42. (IF = 2,79; liczba cytowań = 0)

*Wkład pracy habilitanta: 60 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku*

**H-4: Jedziniak, P.**, Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., Smulski, S., Kaczmarowski, M., & Zmudzki, J. (2013). Identification of flunixin glucuronide and depletion of flunixin and its marker residue in bovine milk. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. doi:10.1111/jvp.12035 (IF = 1,81; liczba cytowań = 0)

*Wkład pracy habilitanta: 70 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku*

**H-5: Jedziniak, P.**, Pietruk, K., Sledzińska, E., Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & Zmudzki, J. (2013). Rapid method for the determination of metamizole residues in bovine muscle by LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 30(6), 977–982. (IF = 1,76; liczba cytowań = 0)

*Wkład pracy habilitanta: 80 %, opracowanie koncepcji pracy, synteza, opracowanie wyników i przygotowanie pracy do druku*

#### **4c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.**

##### *Wstęp*

Współczesna produkcja żywności nastawiona na wysoką wydajność nierzadko musi zmierzyć się z wyzwaniami takimi jak utrzymanie odpowiedniego stanu zdrowia i higieny wśród zwierząt. Stąd też konieczność stosowania szerokiej gamy produktów leczniczych weterynaryjnych oraz dodatków paszowych o działaniu farmakologicznym

nie tylko w przypadku wystąpienia chorób u zwierząt, ale również profilaktycznie. Zachowanie odpowiedniego balansu pomiędzy stosowaniem leków w produkcji zwierzęcej a wyprodukowaniem bezpiecznej dla konsumenta żywności stanowi istotny problem współczesnej hodowli zwierząt gospodarskich.

Wśród produktów leczniczych stosowanych w weterynarii na uwagę zasługuje coraz szersze stosowanie leków przeciwzapalnych, towarzyszące najczęściej terapii antybiotykowej. Wiedza na temat mechanizmów zapalnych w organizmie oraz dążenie do ograniczenia bólu w stanach chorobowych zwierząt sprawiły, że wprowadzono do medycyny weterynaryjnej szeroką gamę skutecznych leków przeciwzapalnych m.in. niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ). Ta grupa farmaceutyków stosowana jest m.in. w ograniczaniu bólu pooperacyjnego, w przypadkach kolki u koni, w leczeniu bezmleczności poporodowej u trzody chlewnej, w zapaleniach gruczołu mlekowego u bydła i wielu innych schorzeniach.

#### *Charakterystyka leków z grupy NLPZ*

Mechanizm działania NLPZ polega na hamowaniu działania cyklooksygenazy, enzymu uczestniczącego w jednym z etapów reakcji zapalnej organizmu, prowadzącego do powstawania prostaglandyn, odgrywających z kolei ważną rolę homeostatyczną w organizmie. Ich funkcja polega na regulacji szeregu procesów fizjologicznych, takich jak ochrona przewodu pokarmowego, prawidłowe funkcjonowanie nerek, procesy rozrodcze oraz przebieg reakcji zapalnej.

NLPZ metabolizowane są głównie w wątrobie. W pierwszej fazie metabolizmu najczęściej zachodzi reakcja utleniania, np. fluniksyna → 5-hydroksyfluniksyna (Anon 1999) lub dealkilacji, np. metamizol → 4-metyloaminoantypiryna (Anon 1998). Niektóre leki (aspiryna, karprofen i fluniksyna) podlegają również metabolizmowi drugiej fazy i sprzęgane są m.in. z kwasem glukuronowym (Brady et al. 1998). Metabolity oraz leki w postaci niezmienionej są wydalane głównie z moczem (Boothe D.M. 1995).

Działania niepożądane leków z grupy NLPZ dotyczą w szczególności przewodu pokarmowego, centralnego układu nerwowego, wątroby, nerek, układu krwionośnego i skóry. Najczęstszymi powikłaniami po doustnym stosowaniu NLPZ jest podrażnienie śluzówki przewodu pokarmowego, zwłaszcza żołądka i dwunastnicy. Podawane leki blokują syntezę prostaglandyn odpowiedzialnych za zmniejszanie wydzielania kwasu solnego oraz nasilenie wydzielania jonów wodorowęglanowych. Skutkiem tego może być podrażnienie śluzówki objawiające się wymiotami, nudnościami i bólem, a mogące prowadzić do owrzodzeń i krwawienia.

#### *Problematyka pozostałości NLPZ w żywności pochodzenia zwierzęcego*

Stosowanie leków u zwierząt wiąże się z występowaniem w ich tkankach, a także produktach takich jak mleko czy jaja, pozostałości czyli substancji czynnych leków,

w tym aktywnych i pomocniczych, oraz produktów rozpadu, metabolizmu i zanieczyszczeń. Pozostałości te mogą mieć negatywny wpływ na zdrowie konsumentów. W przypadku leków zarejestrowanych do stosowania u zwierząt dostarczających żywności, konieczna jest ich ocena pod względem wpływu na zdrowie konsumentów. W celu zapewnienia ich bezpiecznego poziomu w żywności wprowadzono maksymalne limity pozostałości (ang. maximum residue limit, MRL). Dla tych leków, dla których brakuje danych toksykologicznych i nie są dopuszczone do stosowania u zwierząt dostarczających żywność (fenylobutazon, ibuprofen, naproksen, kwas mefenamowy, kwas flufenamowy) obowiązują limity analityczne (ang. recommended concentration) zalecane przez unijne laboratorium ds. pozostałości leków (EURL) (Tabela 1).

Tabela 1. Wybrane wartości maksymalnych limitów pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego dla niesteroidowych leków przeciwzapalnych (Anon 2010)

Lek/pozostałość markerowa	Tkanka docelowa	MRL [ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]		
		bydło	trzoda	konie
karprofen/ suma karprofenu i glukuronidu karprofenu	mięśnie	500	-	500
	wątroba	1000	-	1000
fluniksyna/ 5-hydroksy fluniksyna	mięśnie	20	50	50
	wątroba	300	200	100
	mleko	40	-	-
meloksykam/ meloksykam	mięśnie	20	20	20
	wątroba	65	65	65
	mleko	15	-	-
metamizol/ 4-metylaminoantypiryna	mięśnie	200	-	-
	wątroba	200	-	-
	mleko	50	-	-
kwas tolfenamowy/ kwas tolfenamowy	mięśnie	50	50	-
	wątroba	400	400	-
	mleko	50	-	-
wedaprofen/ wedaprofen	mięśnie	-	-	50
	wątroba	-	-	100
diklofenak/ diklofenak	mięśnie	5	5	-
	wątroba	5	5	-
	mleko	0,1	-	-
fenylobutazon/fenylobutazon	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*
oksyfenbutazon/oksyfenbutazon	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*
ibuprofen/ ibuprofen	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*
naproksen/naproksen	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*
kwas mefenamowy/ kwas mefenamowy	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*
kwas flufenamowy/kwas flufenamowy	żywność pochodzenia zwierzęcego	5*	5*	5*

\*limity zalecane przez EURL

Badania pozostałości leków przeciwzapalnych w żywności prowadzone są od szeregu lat we wszystkich krajach UE. Procent wyników niezgodnych w badaniach

kontrolnych pozostałości NLPZ na terenie UE jest niski, w latach 2004-2007 mieścił się w granicach 0,15-0,34% (Anon 2012). Najczęściej stwierdzanymi analitami był fenylobutazon (wraz z metabolitem oksyfenbutazonem), fluniksyna, kwas tolfenamowy i metamizol. Przekroczone poziomy pozostałości wykrywano głównie u bydła (50% próbek niezgodnych), trzody chlewnej (20%) i koni (15%).

#### *Metodyka oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych*

Analityka pozostałości w żywności pochodzenia zwierzęcego jest trudną dziedziną toksykologii. Lista substancji jakie są kontrolowane przekracza obecnie dwieście pozycji i jest z roku na rok rozszerzana. Obserwowana jest również tendencja do oznaczania substancji macierzystych i ich metabolitów na coraz niższych poziomach. Śladowe stężenia leków w złożonych matrycach (tkankach, moczu, mleku, jajach, miodzie) powodują, że zarówno etap przygotowania próbki jak i analizy instrumentalnej musi być specjalnie optymalizowany. W trakcie opracowywania metody oznaczania pozostałości konieczna jest szeroka wiedza na temat właściwości chemicznych oznaczanych cząsteczek, jak również charakterystycznych cech matrycy w których są oznaczane (np. zawartość białka, wody i tłuszczu). Pozwala to na właściwy dobór odczynników do ekstrakcji analitów i sposobu oczyszczania otrzymanego ekstraktu. Właściwości chemiczne oznaczanych związków mają też istotny wpływ na warunki analizy instrumentalnej takie jak dobór kolumny chromatograficznej, fazy ruchomej czy trybu jonizacji w technice spektrometrii mas.

Warto podkreślić zmiany, jakie dokonały się w kontroli pozostałości leków weterynaryjnych na przestrzeni ostatnich 10 lat, a które można dobitnie wykazać na przykładzie analityki pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W przeszłości brakowało limitów w żywności dla przeważającej części leków a większość analiz wykonywano za pomocą technik chromatograficznych połączonych z detektorami spektrofotometrycznym (ewentualnie z matrycą diodową) i fluorescencyjnym. Osiągane granice oznaczalności mieściły się w zakresie 10-100 µg/kg. Metodyka oznaczania pozostałości NLPZ w mleku techniką HPLC-UV opracowana przez habilitanta w ramach pracy doktorskiej, spełniała ówczesne wymagania dla kontroli pozostałości leków przeciwzapalnych w mleku (Jedziniak et al. 2009). Niedługo potem Unijne Laboratorium Referencyjne ds. pozostałości NLPZ w Berlinie zaproponowało limity dla diklofenaku (dla którego niedawno wprowadzono wartość MRL w mleku 0,1 µg/kg), fenylobutazonu, naproksenu i kwasu mefenamowego na poziomie 5 µg/kg. Ponadto pojawiły się w weterynarii nowe grupy leków przeciwzapalnych m.in. koksyby. Spowodowało to konieczność opracowania nowej, znacznie czulszej metodyki oznaczania pozostałości omawianej grupy leków w oparciu o technikę chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS). Technika ta pozwoliła nie tylko na osiągnięcie niższych limitów oznaczania ale jednocześnie umożliwiła oznaczania kilkudziesięciu a nawet kilkuset analitów.

Pomimo wysokich kosztów aparatury stała się ona techniką z wyboru w analityce pozostałości nie tylko w procedurach potwierdzających ale również jako przesiewowych.

Wielość analizowanych związków, złożoność matryc oraz wymagane niskie limity oznaczalności powodują, że brakuje w tej dziedzinie analityki zatwierdzonych w postaci norm procedur analitycznych. Zespoły naukowców w laboratoriach oznaczających pozostałości zmuszone są zatem same opracowywać metody analityczne na podstawie własnego doświadczenia, dostępnych publikacji naukowych czy zaleceń Wspólnotowych Laboratoriów Referencyjnych.

Opracowanie metody jest dopiero pierwszym etapem jej wdrożenia do badań kontrolnych. Następnie przeprowadza się etap walidacji (weryfikacja wewnątrzlaboratoryjna), w której poprzez analizę serii próbek matrycy wzbogacanej mieszaninami wzorców wyznacza się poszczególne parametry tj. liniowość, dokładność, precyzję, wykrywalność czy niepewność metody. Kryteria dla ww parametrów zostały określone w prawodawstwie UE (Anon 2002). Kolejnym krokiem jest weryfikacja zewnątrzlaboratoryjna w formie międzylaboratoryjnych badań biegłości. Zarówno poprawne wyniki walidacji, jak i badań biegłości są podstawą do akredytacji metody zgodnie z norma PN-ISO 17025 i włączenia jej do programu badań kontrolnych.

Opracowywane metody mają kluczowe znaczenie w programach kontroli pozostałości realizowanych w każdym kraju UE. Zakład Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB, pełniący funkcję Krajowego Laboratorium Referencyjnego, corocznie tworzy założenia programu kontroli będąc również odpowiedzialnym za opracowywanie nowych metod analitycznych. W ramach tego programu badanych jest kilkadziesiąt tysięcy próbek żywności pochodzenia zwierzęcego (tkanek zwierząt, mleka, miodu itp.) pod kątem obecności kilkudziesięciu leków weterynaryjnych oraz zanieczyszczeń środowiskowych takich jak pestycydy, mikotoksyny i metale ciężkie. Corocznie badanych jest około 200 próbek mięśni zwierząt i mleka w kierunku pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych.

### **Celami podjętych badań były:**

#### **1. Stworzenie warsztatu metodycznego oznaczania pozostałości NLPZ w żywności pochodzenia zwierzęcego.**

Wymagania prawodawstwa UE w zakresie bezpieczeństwa żywności wskazują na konieczność monitorowania kilkunastu grup leków weterynaryjnych w tym niesteroidowych leków przeciwzapalnych (Anon 2002). Analityka tych związków naraża na poważnych trudności. Poza wspomnianą już niejednorodnością we właściwościach chemicznych i szerokim zakresem oznaczanych stężeń, niektóre związki są niestabilne podczas analizy (m.in. fenylobutazon). Dodatkowym utrudnieniem jest również konieczność oznaczania metabolitów związków. W przypadku oznaczania



fluniksyny w mleku jej pozostałością markerową jest 5-hydroksyfluniksyna, natomiast 4-metyloaminoantypiryna wskazuje na obecność pozostałości metamizolu. Informacje na temat losów NLPZ w organizmach wskazują na ich metabolizowanie poprzez sprzężanie m.in. z kwasem glukuronowym i powstawanie glukuronidów. W przypadku niektórych leków z omawianej grupy (np. karprofenu) pozostałość markerowa została wyrażona jako suma stężenia leku w formie wolnej oraz związanej w postaci glukuronidu. Wymusza to jednocześnie wprowadzenie do etapu przygotowania próbki hydrolizy (enzymatycznej lub chemicznej).

Opisane trudności spowodowały niewielką liczbę publikacji opisujących procedury oznaczania pozostałości NLPZ w żywności pochodzenia zwierzęcego (Dubreil-Chéneau et al. 2011; Gentili et al. 2012; Hu et al. 2012). Z drugiej strony pojawiająca się tendencja do obniżania limitów wybranych leków przeciwzapalnych (Tabela 1) wymusza stosowanie coraz nowocześniejszych technik analitycznych opartych przede wszystkim na spektrometrii mas. Ważnym zadaniem było zatem opracowanie metod oznaczania pozostałości szerokiej gamy NLPZ w tkankach i mleku, które spełniałyby wymagania prawodawstwa UE.

**Ta część badań była wykonywana w kolejnych częściach:**

*1a) opracowanie metod oznaczania pozostałości NLPZ w mięśniach zwierząt techniką chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS)*

Przegląd piśmiennictwa, analiza limitów NLPZ w różnych matrycach oraz doświadczenia własne wskazywały, że odpowiednią tkanką dla kontroli pozostałości są mięśnie, natomiast właściwą techniką chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas. Wybrano zakres analitów oznaczany w opracowywanej metodzie, która obejmowała następujące związki: fluniksyna, fenylobutazon, oksyfenylobutazon, diklofenak, kwas tolfenamowy, kwas mefenamowy, meloksykam, naproksen, karprofen oraz ketoprofen.

W pierwszym etapie optymalizowano warunki detekcji NLPZ techniką LC-MS/MS. W tym celu wprowadzono roztwory wzorcowe poszczególnych analitów do aparatu i wybrano parametry pracy detektora tj: jon macierzysty oraz jony fragmentacyjne, wartości pracy interfejsu (napięcie deklasterujące, natężenia przepływu gazu kurtynowego i rozpylającego, napięcie kapilary), oraz parametry pracy linii transferu i fragmentacji jonów (energia kolizyjna). Dla każdego analitu badano dwie reakcje fragmentacji jonu macierzystego, co jest podstawowym wymaganiem dla metod potwierdzających.

Opracowano oryginalne warunki rozdzielania chromatograficznego, który przeprowadzano z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem typu C18 oraz fazą ruchomą złożoną z mieszaniny acetonitrylu z 0,1% kwas mrówkowy w trybie elucji gradientowej.

W etapie przygotowania próbki do analizy wprowadzono opisywaną wyżej hydrolizę enzymatyczną przy pomocy beta-glukuronidazy. Hydroliza była przeprowadzana w warunkach kontrolowanego pH (zastosowano bufor octanowy o pH 4,5) oraz temperatury (inkubacja przez 60 min w temperaturze 37°C). Następnie anality ekstrahowano dwukrotnie przy pomocy acetonitrylu. Po wirowaniu próbek zbierano supernatant, który był oczyszczany z wykorzystaniem dwu kolumnienek: wypełnionych tlenkiem glinu oraz sorbentem typu C18. Po zagęszczeniu oczyszczonego ekstraktu w strumieniu azotu, sucha pozostałość była rozpuszczana w fazie ruchomej i analizowana techniką LC-MS/MS.

Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami prawa Unii Europejskiej. Wyznaczono następujące parametry charakteryzujące opracowaną metodę: liniowość, dokładność (odzysk), precyzje (powtarzalność i odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjną), odporność metody a także efekt matrycy. Odzysk, w zależności od analitu mieścił się w granicach 54-135%. Badania powtarzalności (2,4-17,8%, CV%), odtwarzalności wewnątrzlaboratoryjnej (6,6-27,8%, CV%) oraz niskie wartości limitu decyzyjnego CCalfa potwierdziły przydatność opracowanej metody.

Ważnym osiągnięciem było potwierdzenie obecności pozostałości fenylobutazonu (48,9 µg/kg) oraz jego metabolitu oksyfenylobutazonu (384 µg/kg) w mięsie końskim eksportowanym do krajów UE. Wynik ten został również umieszczony w bazie systemu ostrzegania o zanieczyszczeniach żywności Rapid Alert System for Food and Feed (**H-1**).

Opracowana metoda stosowana jest do dzisiaj w programie badań kontrolnych pozostałości, natomiast zyskała na szczególnym znaczeniu na początku roku 2013, kiedy to ujawniono przypadki fałszowania wołowiny mięsem końskim. Badania prowadzone w Irlandii wykazały, że niektóre partie mięsa końskiego mogą zawierać pozostałości fenylobutazonu. Kompetentne organy UE nakazały poszczególnym krajom przebadanie dodatkowych próbek koniny pod kątem występowania w nich niedozwolonych pozostałości tego leku przeciwwzapalnego. W tym czasie Polska jako jeden z zaledwie 5 krajów UE posiadała odpowiednią metodę oznaczania fenylobutazonu.

Istotnym zagadnieniem okazały się badania efektu matrycy, parametru ściśle związanego ze stosowaniem techniki LC-MS/MS (Antignac et al. 2005). Polega on na zjawisku obniżenia (tzw. supresja jonów) lub podwyższania wartości sygnału analitów na skutek interferencji pomiędzy jonizującymi w interfejsie spektrometru mas analitami i pozostałymi cząsteczkami obecnymi w próbce. Mechanizm ten może prowadzić to uzyskiwania wyników fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych. Sposobami na ograniczenie lub wyeliminowanie efektu matrycy jest przez wszystkim właściwe przygotowywanie próbek do analizy oraz stosowanie odpowiednich standardów wewnętrznych. Opracowana procedura oznaczania pozostałości NLPZ w mięśniach posłużyła do wykonania dokładniejszych badań wpływu efektu matrycy na wiarygodność uzyskiwanych wyników (**H-3**). Przebadano różnice w efekcie matrycy

w analizie próbek mięśni różnych gatunków zwierząt (bydła, trzody, koni, drobiu), jak również wpływ konstrukcji źródła jonów (interfejsu) spektrometru mas na opisywane zjawisko. Ważnym osiągnięciem autorów jest propozycja wprowadzenia kryterium dla efektu matrycy jako parametru walidacji metod oznaczania pozostałości, opartego o największy dopuszczany rozrzut efektu (CV = 25%).

Drugą częścią prowadzonych badań było opracowanie metody oznaczania metabolitów metamizolu w tkankach zwierząt. Odmienność chemiczna metamizolu oraz jego metabolitów (4-metyloaminoantypiryny, 4MAA; 4-acetyloaminoantypiryny, 4-formyloaminoantypiryny, 4-aminoantypiryny) powoduje konieczność zastosowania nieco innych warunków przygotowania próbek do analizy, a przez to opracowanie oddzielnej metody analitycznej. Dodatkowym wyzwaniem jest niestabilność metabolitu 4MAA (pozostałość markerowa) w czasie analizy. Warto wspomnieć, że opublikowano jedynie kilka metod pozwalających na analizę poszczególnych metabolitów (Malone et al. 2009), natomiast żadna z nich nie spełniała wymagań metody potwierdzającej obecność metabolitów metamizolu w mięśniach zgodnie z wymaganiami Decyzji Komisji 2002/657/EC (Commission Decision 2002).

Przygotowanie mięśni do analizy polegało na ekstrakcji próbki (2 g) mieszaniną acetonitrylu i buforu octowego o pH 5,0 (w proporcji 8:2). Następnie ekstrakt był oczyszczany przy pomocy kolumniek wypełnionych tlenkiem glinu i oznaczany techniką LC-MS/MS. Rozdział analitów przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny z wypełnieniem typu C8 oraz fazą ruchomą złożoną z mieszaniny metanolu i acetonitrylu (8:2) oraz 0,01 M roztworu octanu amonu o pH 5,0.

Metoda została poddana walidacji. Odzysk, w zależności od metabolitu mieścił się w granicach 45-96%. Powtarzalność (5,0-17%, CV%) oraz odtwarzalność wewnątrzlaboratoryjna (7,0-30%, CV%) potwierdziły przydatność opracowanej metody do kontroli pozostałości metabolitów metamizolu.

Również w tych badaniach weryfikowano wpływ efektu matrycy na wyniki walidacji. Udowodniono, że próbki mięśni różnych gatunków zwierząt mogą nieznacznie różnić się wywoływany efektem.

Warto podkreślić, że opracowana metoda jest pierwszą opublikowaną metodą potwierdzającą pozwalającą na oznaczanie wszystkich metabolitów metamizolu w mięśniach różnych gatunków zwierząt (**H-5**).

*1b) opracowanie metody oznaczania pozostałości NLPZ w mleku techniką LC-MS/MS*

Szczególnym wyzwaniem było podjęcie się opracowania metody pozwalającej na równoczesne oznaczanie 19 leków przeciwpalnych w mleku krowim (tzw. kwaśne NLPZ: diklofenak, fluniksyna, 5-hydroksyfluniksyna, karprofen, ibuprofen, ketoprofen, kwas mefenamowy, kwas tolfenamowy, meloksykam, naproksen, fenylobutazon, oksyfenbutazon; leki z grupy koksylów: celekoksyl, firokoksyl, rofekoksyl; oraz

metabolity metamizolu: 4-metyloaminoantypiryna, 4-formyloaminoantypiryna, 4-acetyloaminoantypiryna, 4-aminoantypiryna). Pierwszą trudnością było osiągnięcie niskiej granicy oznaczalności diklofenaku w mleku (poniżej wartości maksymalnego limitu pozostałości równego 0,1 µg/kg). Po drugie, założeniem było oznaczanie jak najszerszej gamy leków przeciwzapalnych (koksybów) oraz metabolitów metamizolu. Różnice w budowie chemicznej powyższych związków utrudniały opracowanie wspólnych warunków izolacji analitów z matrycy oraz analizy instrumentalnej.

Opracowana metoda obejmowała ekstrakcję analitów z matrycy techniką cieczi-ciecz przy pomocy acetonitrylu w obecności chlorku sodu. Następnie ekstrakt był dzielony na dwie części: jedna służyła do analizy metabolitów metamizolu, druga (dodatkowo oczyszczana za pomocą kolumnienek z sorbentem aminowym) do analizy pozostałych analitów. Do analizy ilościowej i jakościowej wykorzystano technikę chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas.

Opracowana metoda została poddana walidacji zgodnie z wymaganiami Unii Europejskiej opisanymi w Decyzji Komisji 2002/657/EC. Wyniki walidacji wskazują na przydatność metody w kontroli pozostałości szerokiej gamy najczęściej stosowanych u zwierząt leków przeciwzapalnych w szczególności w kontekście konieczności oznaczania diklofenaku na poziomie 0,1 µg/kg.

Metoda została sprawdzona w badaniach biegłości zorganizowanych przez Unijne Laboratorium Referencyjne w Berlinie, w których uczestniczyło 40 laboratoriów z całego świata. Badano próbki mleka z wbudowanymi pozostałościami diklofenaku, fenylobutazonu, meloksykamu oraz metamizolu. Uzyskano satysfakcjonujące wyniki, które świadczą o wiarygodności opracowanej metody.

Opublikowana praca stanowi jedną z nielicznych publikacji opisujących wieloskładnikową metodę oznaczania pozostałości leków przeciwzapalnych w mleku (H-2).

## **2. Badania nad identyfikacją metabolitu fluniksyny (glukuronidu fluniksyny) w mleku krowim**

Fluniksyna jest popularnym lekiem przeciwzapalnym stosowanym u zwierząt w przypadkach bólu i zapalenia przy urazach układu mięsno-szkieletowego, kolki u koni, ostrych zapaleniach w chorobach zakaźnych u bydła, bezmleczności poporodowej u trzody, oraz zapaleniu płuc u bydła. Jest jednym z nielicznych leków przeciwzapalnych dopuszczonych do stosowania u bydła mlecznego.

Pomimo dość dokładnych badań przechodzenia pozostałości leku do tkanek zwierząt i mleka pojawiały się w piśmiennictwie sprzeczne dane dotyczące przechodzenia do mleka metabolitów fluniksyny. Kontrowersje dotyczyły obecności w mleku glukuronidu fluniksyny (FLU-GLU). Pierwsze doniesienie nt. możliwości

przechodzenia FLU-GLU do mleka opublikował Rupp i współpracownicy (Rupp et al. 1995). Autorzy zauważyli różnicę w stężeniu oznaczanej fluniksyny w mleku w zależności od stosowania hydrolizy z enzymem beta-glukuronidazą. W przypadku zastosowania etapu hydrolizy stwierdzano wyższe stężenie fluniksyny w próbce mleka od krowy, której podano lek. Był to pośredni dowód na to, że w mleku występuje FLU-GLU. Wyniki tych badań zostały podważone przez naukowców pracujących dla firmy farmaceutycznej, która zarejestrowała preparat z fluniksyną do stosowania u krów mlecznych (Feely et al. 2002). Zdaniem Feely'ego badania zespołu Rupp'a były przeprowadzone na zbyt małej liczbie zwierząt (n=1) i w związku z tym były niewiarygodne. Zespół habilitanta powtórzył doświadczenie Rupp'a z wykorzystaniem grupy zwierząt (n=6) i uzyskał podobne wyniki: stężenie fluniksyny w próbkach mleka istotnie wzrastało w analizach z etapem hydrolizy enzymatycznej. Na podstawie otrzymanych wyników oszacowano również stopień wiązania fluniksyny z kwasem glukuronowym wynoszący około 73% (Tabela 1).

Tabela 1. Odsetek skoniugowanej fluniksyny w mleku krów dojonych 12 godzin po podaniu leku

Zwierzę/ podanie leku	% skoniugowanej fluniksyny						Średnia ±SD*
	1	2	3	4	5	6	
Podanie 1	60.6	32.7	100.0	48.8	89.2	100.0	71.9±28.6
Podanie 2	59.8	39.4	71.6	94.0	73.0	93.4	71.9±20.8
Podanie 3	54.6	62.4	73.4	81.0	79.2	87.6	73.0±12.4
Średnia	58.3	44.8	81.7	74.6	80.5	93.7	

\*SD – odchylenie standardowe

Potwierdzenie wyników badań Rupp'a stanowiło jedynie dowód pośredni na przechodzenie FLU-GLU do mleka krów. Podjęto zatem badania nad identyfikacją metabolitu z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS wykorzystującej zalety pułapki jonowej (H-4). Spektrometr skanował analizowane próbki mleka w szerokim zakresie mas dzięki czemu zidentyfikowano obecność jonów odpowiadających masie metabolitu. Następnie przeprowadzono fragmentację tych jonów w celi kolizyjnej udowadniając, że jest ona zbieżna z fragmentacją jonu macierzystego fluniksyny.

Pozwoliło to na jednoznaczny identyfikację piku metabolitu na chromatogramie oraz zebranie widma fragmentacyjnego związku. Uzyskane wyniki mają dość dużą wartość poznawczą, udowodniono możliwość transferu FLU-GLU do mleka krowiego.

## Osiągnięcia:

**1. Opracowanie potwierdzającej metody oznaczania 10 niesteroidowych leków przeciwzapalnych w tkankach zwierząt techniką LC-MS/MS oraz wdrożenie jej do programu badań kontrolnych. Wykorzystanie opracowanej procedury do**

potwierdzania (po raz pierwszy w Polsce) pozostałości fenylobutazonu i oksyfenylobutazonu w próbce mięśni koni. **(H-1)**

2. **Opracowanie propozycji kryterium dla nowego parametru walidacji - efektu matrycy**, który ma wynosić 25% współczynnika zmienności w badaniach efektu. **(H-3)**
3. **Opracowanie jednej z pierwszych na świecie procedury potwierdzającej oznaczania pozostałości metabolitów metamizolu w mięśniach różnych gatunków zwierząt.** **(H-5)**
4. **Opracowanie wieloskładnikowej metody oznaczania pozostałości leków przeciwzapalnych w mleku** pozwalającej na jednoczesne oznaczanie „kwaśnych” NLPZ, koksylbów oraz metabolitów metamizolu. Jednocześnie metoda pozwala na oznaczanie pozostałości diklofenaku w mleku na poziomie 0,1 µg/kg (MRL wprowadzony w 2010 roku). **(H-2)**
5. **Identyfikacja metabolitu fluniksyny - glukuronidu fluniksyny w mleku krów otrzymujących dożylnie fluniksynę.** **(H-4)**

Piśmiennictwo:

- Anon, 2002. Commission Decision no 2002/657/EC of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Union L 15/1*, 221, pp.1–29.
- Anon, 2010. Commission Regulation (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union L 15/1*, (2377).
- Anon, 1999. *Flunixin: Summary Report(1)*, EMEA/MRL/661/99-FINAL. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- Anon, 1998. *Metamizole: Summary Report(1)*, EMEA/MRL/529/98-FINAL CORRIGENDUM, The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
- Anon, 2012. *Report for 2010 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products*, European Food Safety Authority, Supporting Publications 2012:212.
- Antignac, J.-P. et al., 2005. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. *Analytica Chimica Acta*, 529(1-2), pp.129–136.

- Boothe D.M., 1995. The analgesic-antipyretic-anti-inflammatory drugs. In Adams H.R., ed. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 7th*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 432–446.
- Brady, T.C. et al., 1998. Isolation, purification, and structural characterization of flunixin glucuronide in the urine of greyhound dogs. *Drug Metabolism And Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 26(4), pp.294–8.
- Dubreil-Chéneau, E. et al., 2011. Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1218(37), pp.6292–301.
- Feely, W.F. et al., 2002. Flunixin residues in milk after intravenous treatment of dairy cattle with (14)C-flunixin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(25), pp.7308–13.
- Gentili, A. et al., 2012. Development and validation of two multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry methods based on a versatile extraction procedure for isolating non-steroidal anti-inflammatory drugs from bovine milk and muscle tissue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(5), pp.1375–88.
- Hu, T. et al., 2012. Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1219, pp.104–13.
- Jedziniak, P., et al., 2009. Multi-residue screening method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in cow ' s milk with HPLC-UV and its application to meloxicam residue depletion study. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 53, pp.731–739.
- Malone, E.M. et al., 2009. Development of a rapid, multi-class method for the confirmatory analysis of anti-inflammatory drugs in bovine milk using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216(46), pp.8132–40.
- Rupp, H. et al., 1995. Determination of flunixin in milk by liquid chromatography with confirmation by gas chromatography/mass spectrometry and selected ion monitoring. *Journal of AOAC International*, 78, pp.959–967.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo – badawczych

**5a) pozostały dorobek publikacyjny**

## **Farmakokinetyka leków przeciwzapalnych u bydła, zanikanie ich pozostałości w mleku oraz przechodzenie do produktów mlecznych (badania prowadzone przed doktoratem)**

W pierwszym okresie pracy naukowej zajmowałem się badaniami farmakokinetyki fluniksyny podawanej bydłu. Ważnym osiągnięciem tych badań było równoczesne wskazanie na profil zanikania metabolitu 5-hydroksyflunikszy w osoczu.

W ramach pracy doktorskiej opracowana została metoda oznaczania pozostałości niesteroidowych leków przeciwzapalnych w mleku metodą chromatografii z detektorem spektrofotometrycznym. Opracowana metoda została wykorzystana do badań zanikania pozostałości meloksykamu flunikszy i 5-hydroksyflunikszy w mleku krowim, jak również w badaniach przechodzenia flunikszy i meloksykamu do produktów mleczarskich takich jak masło, śmietana, ser.

Efektom tych badań były następujące publikacje:

**Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., & Olejnik, M. (2009). Multi-residue screening method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drug residues in cow's milk with HPLC-UV and its application to meloxicam residue depletion study. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 53, 731–739. (IF = 0,43; liczba cytowań = 1)

**Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T ; Olejnik, M., & Jaroszewski, J. (2007). Determination of flunixin and 5-hydroxyflunixin in bovine plasma with HPLC-UV-method development, validation and verification. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 51(2), 261–266. (IF = 0,48; liczba cytowań = 8)

Szprengier-Juszkiewicz, T., **Jedziniak, P.**, Olejnik, M., & Kaczmarowski, M. (2009). Meloxicam in treated dairy cows-residues in milk and milk products. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 32, 192–193. (IF = 1,18; liczba cytowań = 0)

Jaroszewski, J., **Jedziniak, P.**, Markiewicz, W., Grabowski, T., Chrostowska, M., & Szprengier-Juszkiewicz, T. (2008). Pharmacokinetics of flunixin in mature heifers following multiple intravenous administration. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 11(3), 199–203. (IF = 0,52; liczba cytowań = 1)

## **Metodyka oznaczania pozostałości leków przeciw pasożytniczych**

Zwalczanie infekcji pasożytniczych u zwierząt jest wyzwaniem dla hodowców i lekarzy weterynarii. Najczęściej stosowane są leki z grupy makrocyclicznych laktonów (iwermektyna, abamektyna, doramektyna, eprinomektyna, moksydektyna) oraz benzoimidazoli (albendazol, fenbendazol, flubendazol, mebendazol, triklabendazol, kambendazol, tiabendazol). Narastającym problemem jest wzrost lekooporności pasożytów, co jest spowodowane niedostatkami zarejestrowanych leków, brakiem nowych leków, a także błędami w stosowaniu tych leków przez hodowców. Nierzadko



stosowane są preparaty niedopuszczone do stosowania u tych zwierząt, co stoi w sprzeczności z dobrą praktyką hodowlaną.

W związku z coraz większymi wymaganiami prawodawstwa UE w zakresie oznaczania pozostałości leków weterynaryjnych w żywności pochodzenia zwierzęcego zaistniała potrzeba opracowania metod oznaczania leków przeciw pasożytniczych w tkankach zwierząt oraz mleku.

W przypadku oznaczania pozostałości makrocyclicznych laktonów analiza opiera się o technikę chromatografii cieczowej połączonej z detekcją fluorescencyjną. Anality, wyizolowane z próbek wątrób lub mleka oczyszcza się przy pomocy techniki ekstrakcji do fazy stałej (*ang. solid phase extraction, SPE*) przekształca się we fluoryzujące pochodne w reakcji z N-metyloimidazolem. Opracowana metoda została poddana walidacji, przekazana do wykonywania w laboratoriach Zakładów Higieny Weterynaryjnej oraz włączona do krajowego programu badań kontrolnych pozostałości.

Analityka pozostałości benzoimidazoli w mleku została oparta o technikę chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas. Dzięki temu możliwe było oznaczanie, obok substancji macierzystych 8 benzoimidazoli, również ich metabolitów. W sumie opracowana procedura pozwalała na jednoczesne oznaczanie 19 analitów. Metoda ta została również włączona do krajowego programu badań kontrolnych pozostałości.

Efektom tych badań były następujące publikacje:

Szprengier-Juszkiewicz, T., **Jedziniak, P.**, Olejnik, M., & Żmudzki, J. (2012). Control of residues of five macrocyclic lactones in cow milk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 56(4), 595–599. (IF = 0,39; liczba cytowań = 0)

**Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., & Olejnik, M. (2009). Determination of benzimidazoles and levamisole residues in milk by liquid chromatography-mass spectrometry: screening method development and validation. *Journal of Chromatography. A*, 1216(46), 8165–72. (IF = 4,86; liczba cytowań = 15)

### **Problem pozostałości kokcydiostatyków w żywności pochodzenia zwierzęcego**

Jednym z ważniejszych problemów w praktyce hodowlanej jest skuteczne, a zarazem bezpieczne stosowanie kokcydiostatyków. Związki te są stosowane powszechnie w weterynarii do profilaktyki i leczenia kokcydiozy, głównie w postaci dodatków paszowych dopuszczonych zgodnie z rozporządzeniem Komisji Europejskiej 1831/2003/EC. Po wycofaniu antybiotykowych dodatków paszowych kokcydiostatyki są jedynymi związkami farmakologicznie czynnymi dozwolonymi do stosowania u zwierząt w tej postaci we Wspólnocie Europejskiej.

Stosowanie kokcydiostatyków w paszach spowodowało dwojaki rodzaj problemy. W przypadku produkcji pasz dla zwierząt nie docelowych okazało się, że pewien stopień zanieczyszczenia pasz jest niemożliwy do uniknięcia ze względów

technologicznych i ekonomicznych. To z kolei może być przyczyną występowania niepożądanych pozostałości u zwierząt, a w szczególnych przypadkach (np. indyki) zatruć. W związku z tym wprowadzono maksymalne limity zawartości dla kokcydiostatyków w paszach oraz w żywności pochodzenia zwierzęcego.

Wprowadzenie tych limitów spowodowało konieczność opracowania metodyki oznaczania pozostałości kokcydiostatyków w tkankach zwierząt oraz jajach, jak również przeprowadzanie doświadczeń polegających na badaniu przechodzenia wybranych kokcydiostatyków z paszy do jaj i tkanek drobiu.

Opracowana metodyka została wdrożona do badań kontrolnych pozostałości kokcydiostatyków żywności w Polsce. W latach 2007-2010 przebadano ponad 3718 próbek jaj, wątrób, wody oraz paszy. Niezgodne z wymaganiami pozostałości kokcydiostatyków wykryto w 77 (2,1%) próbkach żywności (53 w próbkach wątrób drobiowych, 23 próbkach jaj oraz 1 próbce wątroby indyków). Wyniki wskazują, że główną przyczyną występowania pozostałości w żywności jest stosowanie przez hodowców pasz z zanieczyszczonych kokcydiostatykami.

Efektom tych badań były następujące publikacje:

Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & **Jedziniak, P.** (2009). Multi-residue confirmatory method for the determination of twelve coccidiostats in chicken liver using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. A*, 1216(46), 8141–8. (IF = 4,86; liczba cytowań = 41)

Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & **Jedziniak, P.** (2010). Confirmatory method for determination of coccidiostats in eggs. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 54(2), 327–333. (IF = 0,39; liczba cytowań = 6)

Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., **Jedziniak, P.**, Śledzińska, E., Szymanek-Bany, I., Korycińska, B., Pietruk, K., & Żmudzki, J. (2010). Residue control of coccidiostats in food of animal origin in Poland during 2007 – 2010. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4(1), 258–267. (IF = 0,89; liczba cytowań = 0)

Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., & **Jedziniak, P.** (2011). Depletion study on nicarbazin and narasin in tissues and eggs of hens housed in deep litter. *Bulletin of Veterinary Institute in Pulawy*, 55, 761–766. (IF = 0,41; liczba cytowań = 0)

### **Prace obejmujące tematykę zapewnienia jakości badań w laboratorium**

Wiarygodne badania naukowe opierają się nie tylko na odpowiedniej aparaturze czy doświadczonej kadrze badawczej, ale również na wdrożonym systemie jakości. Stosowanie odpowiednich procedur badawczych, ich walidacja, szacowanie niepewności, korzystanie z różnego rodzaju materiałów odniesienia oraz udział w badaniach międzylaboratoryjnych potwierdzają kompetencje laboratoriów.

W tej dziedzinie prowadzone były badania w zakresie opracowania i zastosowania materiału referencyjnego wytworzonego i ocenionego w laboratorium (*ang. in-house reference material*). Materiał stanowiło mleko z wbudowanymi naturalnie pozostałościami 5-hydroksyfluniksiny (metabolit fluniksiny stanowiący jego pozostałość markerową w mleku). Przygotowany materiał (w postaci liofilizatu) został przebadany pod kątem jednorodności i stabilności. Analiza statystyczna wyników wykazała jego przydatność w sterowaniu jakością laboratorium akredytowanym.

Drugim obszarem badań była analiza wyników uzyskanych w badaniach biegłości. W jednym z testów przygotowanych przez Central Science Laboratory (Irlandia, program FAPAS, nr 0270) zadaniem było oznaczanie pozostałości oksfendazolu (sulfotlenek fenbendazolu – jeden z metabolitów fenbendazolu). Zaobserwowano, że wyniki laboratoriów zależały od metody stosowanej przez uczestników. Organizator nie przewidział takiej sytuacji na etapie przygotowania materiału referencyjnego dla uczestników badań biegłości a popełniony błąd znacznie obniżył wartość uzyskanych wyników.

Efektom tych badań były następujące publikacje:

**Jedziniak, P.**, Szprengier-Juszkiewicz, T., & Olejnik, M. (2009). In-house reference materials: 5-hydroxyflunixin and meloxicam in cow milk-preparation and evaluation. *Analytica Chimica Acta*, 637(1-2), 346–50. (IF = 3,53; liczba cytowań = 3)

Olejnik, M., Szprengier-Juszkiewicz, T., **Jedziniak, P.**, & Żmudzki, J. (2007). Do proficiency tests always verify laboratories' performance? The case of FAPAS PT 0270. *Accreditation and Quality Assurance*, 12(12), 637–641. (IF = 0,85; liczba cytowań = 0)

### **Podsumowanie dorobku naukowego**

Jestem autorem (lub współautorem):

- 20 publikacji naukowych, z czego 19 powstało po doktoracie. Większość artykułów opublikowana została w czasopiśmie z listy JCR,
- 7 rozdziałów w monografiach,
- 48 komunikatów konferencyjnych, w tym 29 na konferencje krajowe oraz 19 na zagraniczne.

**IF (sumaryczny) = 34,3** (z czego prace stanowiące osiągnięcie = **11,6**)

**Index Hirsha = 5**

**Liczba cytowań (czerwiec 2013) = 95 (82 bez autocytowań)**

**Suma punktów MNiSW za prace opublikowane po doktoracie: 510**

### **5b) Udział w projektach badawczych**

Projekt KBN (N N308237138): Badania nad wykrywaniem toksyny botulinowej w materiale biologicznym (2010-2013) – **wykonawca**

Projekt MNiSW „Iuventus Plus” (IP2011 020371): Wieloskładnikowa metoda oznaczania pozostałości leków przeciwzapalnych w żywności (2012-2013)– **kierownik**

Projekt MNiSW „Iuventus Plus” (IP2012 031172): Wieloskładnikowa metoda oznaczania pozostałości leków przeciw pasożytniczych w mleku kozim i owczym oraz wybranych produktach mleczarskich (2013-2015) – **kierownik**

Projekt NCN „Sonata” (2012/07/D/NZ7/03387): Badania nad wpływem metabolizmu salinomycyny na jej toksyczność (2013-2017) – **wykonawca**

Projekt NCN „Sonata” (2012/07/D/NZ7/03242): Pozostałości niedozwolonych barwników syntetycznych w jajach i wybranych produktach jajecznych (2013-2016) - **kierownik**

### **5c) Udział w kursach i szkoleniach**

Szkolenia międzynarodowe:

1. Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Teramo, Włochy. Methods of drug residues detection, part I (maj 2004).
2. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Wykrywanie i oznaczanie pozostałości leków przeciwbakteryjnych metodami chromatografii i spektrometrii mas (Puławy, czerwiec 2006)
3. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Kokcydiostatyki w paszach i ich pozostałości w tkankach zwierząt i żywności zwierzęcego pochodzenia (Puławy, czerwiec 2006)
4. Projekt PHARE PL2003/004-379-04.01.03. Oznaczanie pozostałości hormonów anabolicznych i leków weterynaryjnych metodą spektrometrii mas (Puławy lipiec 2006)
5. Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Teramo, Włochy . Methods of drug residues detection, part II (wrzesień - październik 2006).
6. Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgia, szkolenie " Use of Reference Materials and the Estimation of Measurement Uncertainty" (kwiecień 2008)
7. Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes, Francja, kurs "School for Advanced Residue Analysis in Food"(październik 2008)
8. Community Reference Laboratory for Antimicrobial Residues in Food, Fougères, Francja, szkolenie "Multi-residue and multiclass method of determination of antibiotics in food of animal origin, (listopad 2008)

9. Workshop Community Reference Laboratory, - "Technical, Analytical and Statistical Issues. Berlin, Niemcy (czerwiec 2009)
10. Workshop Community Reference Laboratory, - "Technical, Analytical and Statistical Issues. Berlin, Niemcy (czerwiec 2012)

Szkolenia krajowe:

1. Politechnika Gdańska, Wydział Chemii, kurs "Oznaczanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w próbkach środowiskowych metodą chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas"
2. Szkolenia obsługi zestawów HPLC i LC-MS/MS firm Agilent, ABSciex, Varian.

#### **5d) Nagrody i wyróżnienia**

Nagrody I-stopnia w corocznych konkursach na najlepszą publikację w kategorii prac oryginalnych przyznawana przez Dyrektora PIWet-PIB, Puławy 2010 i 2011

#### **5e) Recenzje**

Byłem recenzentem 22 publikacji w czasopismach naukowych z "Listy Filadelfijskiej": *Journal of Chromatography A*, *Journal of Chromatography B*, *Talanta*, *Analytica Chimica Acta*, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, *Analytical Letters*, *Environmental Monitoring and Assessment*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *Acta Chromatographica*, *Food Analytical Methods*, *Food Research International*.

#### **5f) Udział w sympozjach, konferencjach i kongresach**

- krajowych:

1. kongresy Polskiego Towarzystwa Nauk Weterynaryjnych (2004, 2008)
2. kongresy Polskiego Towarzystwa Toksykologicznego (2006, 2008)
3. kongres Polskiego Towarzystwa Nauk Chemicznych (2007)
4. konferencje: „Jakość w Chemii Analitycznej” (2005, 2006, 2008)
5. konferencja Polskiego Towarzystwa Spektrometrii Mas (2008)

- zagranicznych

1. Eurotox – congress of Federation of European Toxicologists & European Societies of Toxicology (2005)
2. Congress of European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology (EAVPT) (2004, 2006)
3. Euroresidue (2008, 2012)
4. International Symposium On Recent Advances In Food Analysis (2009, 2011)

5. Sixth International Symposium on Hormone and Veterinary Drug Residue Analysis (2010) – referat
6. 29th international Symposium on Chromatography (2011)

#### **5g) Działalność dydaktyczna**

W trakcie pracy zawodowej prowadziłem wykłady specjalizacyjne dla lekarzy weterynarii w Weterynaryjnym Centrum Kształcenia Podyplomowego w Puławach. Ponadto prowadziłem szereg szkoleń teoretycznych (m.in. z zakresu walidacji metod oraz zapewnienia jakości w laboratorium) oraz praktycznych (m.in. wdrożenia metod oznaczania pozostałości leków przeciw pasożytniczych) dla pracowników laboratoriów Zakładów Higieny Weterynaryjnej z całej Polski.

Jestem promotorem pomocniczym mgr Tomasza Kiljanka (tytuł rozprawy doktorskiej: „Wieloskładnikowa metoda oznaczania pestycydów w diagnostyce zatruc pszczoł” - 158 Rada Naukowa PIWet-PIB z 26 czerwca 2013)

#### **5h) Działalność organizacyjna**

Jestem autorem i współwykonawcą następujących inicjatyw:

1. elektronicznego systemu nadzoru nad odczynnikami w PIWet-PIB
2. elektronicznej bazy danych walidacji metod dla laboratoriów ZHW
3. tworzenie systemu jakości w Zakładzie Farmakologii i Toksykologii PIWet-PIB. Jestem autorem (lub współautorem) 11 procedur badawczych oraz 3 instrukcji.
4. koordynacja badań chemicznych w ramach Centralnej Bazy Danych CELAB służącej gromadzeniu i analizie wyników badań laboratoryjnych wykonywanych przez PIWet-PIB oraz jednostki Inspekcji Weterynaryjnej.

**Wykaz całości dorobku naukowego znajduje się z załączniku 3 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego.**

*Piot Jedziniak*