

**POLITECHNIKA ŚLĄSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
KATEDRA CHEMII NIEORGANICZNEJ, ANALITYCZNEJ
I ELEKTROCHEMII**

***Metody rozdzielcze i spektralne dla potrzeb
terapeutycznego monitorowania leków
oraz w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów***

**dr inż. Sylwia Magiera
*Autoreferat***

Gliwice, 2016

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

1. Imię i nazwisko

Sylwia Magiera

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

2008 r. – magister inżynier chemii, specjalność – bioanalitka, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, Gliwice

Tytuł pracy dyplomowej: *Opracowanie metody oznaczania flawonoidów oraz β -blokerów w próbkach moczu*

Promotor: prof. dr hab. Irena Staneczko-Baranowska

2012 r. – doktor nauk chemicznych w dziedzinie chemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, Gliwice

Tytuł rozprawy doktorskiej: *Opracowanie metod oznaczania mieszanin wybranych związków polifenolowych, wybranych leków oraz ich metabolitów i ich aplikacje*

Promotor: prof. dr hab. Irena Staneczko-Baranowska

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1 października 2008 r. – 31 września 2012 r. – asystent w Katedrze Chemii Analitycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, Gliwice

1 października 2012 r. – nadal – adiunkt w Katedrze Chemii Analitycznej, po reorganizacji w Katedrze Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii, Wydział Chemiczny, Politechnika Śląska, Gliwice

4. Zainteresowania naukowe

Chromatografia cieczowa, spektrometria mas, leki i ich metabolity, związki polifenolowe, metody przygotowania próbek, chemia biomedyczna, analiza śladowa

5. 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.)

5.1. Tytuł osiągnięcia

Metody rozdzielcze i spektralne dla potrzeb terapeutycznego monitorowania leków oraz w poszukiwaniu potencjalnych biomarkerów

(Osiągnięcie stanowi jednotematyczny cykl publikacji od H1 do H11, wymienionych w Załączniku 2, których kopie znajdują się w Załączniku 4)

5.2. Autoreferat wraz z omówieniem osiągnięcia naukowego

Wprowadzenie

W 2002 roku rozpoczęłam studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Pracę magisterską wykonywałam na kierunku Chemia, w ramach specjalności Bioanalityka. Tytuł magistra inżyniera chemii uzyskałam 21.06.2008 roku na podstawie pracy pod tytułem „*Opracowanie metody oznaczania flawonoidów oraz β -blokerów w próbkach moczu*”, którą wykonywałam pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Staneczko-Baranowskiej. Podczas realizacji pracy magisterskiej, na 5 roku studiów odbyłam roczny staż dydaktyczny w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej, przygotowujący do pracy na stanowisku asystenta. Podczas stażu poszerzyłam swoją wiedzę z zakresu technik rozdzielczych oraz elektrochemicznych.

Od 1 września 2008 roku zostałam zatrudniona na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej w Gliwicach i równocześnie rozpoczęłam badania będące przedmiotem rozprawy doktorskiej. Moja działalność naukowa związana była głównie z badaniami podstawowymi i aplikacyjnymi do oznaczania flawonoidów, leków β -adrenolitycznych oraz ich metabolitów. Możliwość wystąpienia niebezpiecznych oddziaływań związków polifenolowych na metabolizm leków spowodowały podjęcie badań ukierunkowanych na przygotowaniu „*narzędzi*”, które mogą posłużyć do monitorowania potencjalnych interakcji pomiędzy wymienionymi powyżej związkami.

Szczegółowym przedmiotem badań było opracowanie nowych, nieopisanych dotychczas procedur oraz metod analitycznych do równoczesnego oznaczania wybranych leków, związków polifenolowych i ich metabolitów. W efekcie prowadzonych prac opracowałam metody z zastosowaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorem z matrycą diodową (HPLC-DAD) oraz ultra-sprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu z detektorem spektrofotometrycznym w zakresie UV (UHPLC-UV) do oznaczania wyżej wymienionych grup związków. Badania podstawowe rozszerzyłam poprzez zastosowanie spektrometru mas, jako bardziej selektywnej i czulej metody detekcji w połączeniu z ultra-sprawną chromatografią cieczową (UHPLC-MS/MS). Ważnym zagadnieniem było opracowanie metod izolacji i wzbogacenia analitów z płynów biologicznych z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Opracowane procedury analityczne umożliwiły wykrycie i oznaczenie badanych leków, związków polifenolowych i ich metabolitów w płynach ustrojowych. Z tego zakresu badań opublikowałam 8 prac, których jestem współautorką [1–8].

W trakcie realizacji badań odbyłam 3-miesięczny staż naukowy na Wydziale Chemii Uniwersytetu w Innsbrucku (Institute of Analytical Chemistry and Radiochemistry Leopold-Franzens University). Miałam możliwość pracy naukowej w grupie badawczej prof. Güntera Bonn, specjalisty w zakresie zastosowania metod rozdzielczych i spektroskopowych w bioanalityce. Ponadto podczas pobytu poszerzałam swoją wiedzę z zakresu chromatografii cieczowej na wykładach prof. H. Engelhardta (Universität des Saarlandes). Współpraca z ośrodkiem w Innsbrucku zaowocowała licznymi pomysłami badawczymi, a przede wszystkim opracowaniem alternatywnej metody oznaczania leków, związków polifenolowych i ich metabolitów w moczu pacjentów z zastosowaniem chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS). Efektem przeprowadzonych badań była wspólna publikacja naukowa [5].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

W zastosowaniu opracowanych metod HPLC-DAD, UHPLC-UV, UHPLC-MS/MS oraz GC-MS wykorzystyłam płyny ustrojowe pochodzące od pacjentów ze schorzeniami kardiologicznymi. Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowałam różnice w stężeniach β -blokerów i ich metabolitów w moczu pacjentów przed i po wzbogaceniu diety w produkty bogate w związki polifenolowe. Wykazałam w ten sposób wpływ związków polifenolowych na metabolizm tych leków.

Z danych literaturowych wynika, iż aktywne związki polifenolowe występujące w wielu powszechnie stosowanych preparatach i suplementach diety posiadają właściwości inhibicyjne w stosunku do pewnych enzymów z grupy cytochromu P-450. Produkty bogate we flawonoidy hamują metabolizm zależny od enzymu CYP3A4 w różnym stopniu, przy czym oddziałują głównie poprzez znaczne zmniejszenie aktywności enzymów CYP2C9, CYP2C19 i CYP2D6 [9,10]. Wyniki analiz próbek moczu pochodzących od osób leczonych β -blokerami przed i po spożyciu produktów zawierających polifenole i suplementy diety, potwierdzają tę hipotezę, gdyż zaobserwowałam różnice w zawartości leków oraz ich metabolitów. W moczu osób stosujących dietę i preparaty bogate w antyoksydanty oznaczyłam większą ilość leku, natomiast mniej jego metabolitów w porównaniu z zawartością przed suplementacją. Na podstawie otrzymanych wyników, można wnioskować, iż spadek aktywności enzymu zmniejsza intensywność metabolizmu, a tym samym powoduje wzrost zawartości podstawowej formy leku w płynach biologicznych pacjentów. Może to stanowić zagrożenie dla życia, w wyniku powikłań, wynikających z toksycznego działania wysokiego stężenia niezmetabolizowanego leku. W związku z powyższym oznaczanie leków i ich metabolitów w płynach biologicznych stanowi istotne narzędzie do oceny potencjalnej inhibicji CYP wywołanej podaniem naturalnych produktów roślinnych, a także suplementów diety oraz umożliwia przewidywanie interakcji pomiędzy przeciwutleniaczami a lekami.

W realizacji badań dużą rolę odegrały projekty badawcze, w których pełniłam funkcję kierownika oraz wykonawcy. Był to m.in. grant przyznany przez Narodowe Centrum Nauki, kierowany przez prof. dr hab. Irenę Staneczko-Baranowską (N N204 355840), którego byłam wykonawcą oraz projekt badawczy dla młodych naukowców, finansowany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Iuventus Plus, którego byłam kierownikiem. Efektem prowadzonych badań było 9 publikacji naukowych oraz 13 wystąpień ustnych i prezentacji posterowych.

Wspomniane przeze mnie publikacje naukowe złożyły się na przygotowaną pod kierunkiem prof. dr hab. Ireny Staneczko-Baranowskiej rozprawę doktorską zatytułowaną „*Opracowanie metod oznaczania mieszanin wybranych związków polifenolowych, wybranych leków oraz ich metabolitów i ich aplikacje*”, którą z wyróżnieniem obroniłam 1 czerwca 2012 roku. Rozprawa doktorska została wyróżniona również nagrodą Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk i firmy Perlan Technologies za najlepszą pracę doktorską w dziedzinie chemii analitycznej związaną z rozwojem technik rozdzielania (prace za lata 2013/2014).

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych, zostałam zatrudniona na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej na stanowisku adiunkta (w okresie od 1 października 2012 roku do chwili obecnej). Zdobyte przez kilka lat doświadczenie w zastosowaniu opracowanych procedur analitycznych, pozwoliło mi na poszerzenie i zgłębienie tematyki badawczej dotyczącej nowych rozwiązań metodycznych stosowanych na etapie ekstrakcji i oznaczania związków biologicznie aktywnych w płynach ustrojowych.

Poszukiwanie biomarkerów oraz terapeutyczne monitorowanie leków

W czasopismach medycznych pojawia się coraz więcej artykułów poświęconych badaniom nad poszukiwaniem nowych biologicznych cząsteczek, tzw. biomarkerów, które mogłyby w przyszłości odegrać istotną rolę **we wczesnej, nieinwazyjnej diagnostyce schorzeń sercowo-naczyniowych** [11,12]. Według definicji Narodowego Instytutu Zdrowia (*National Institute of Health, NIH*), marker biologiczny to substancja posiadająca charakterystyczne cechy, które mogą być obiektywnie zmierzone. Może być wskaźnikiem procesów fizjologicznych, patologicznych lub odpowiedzi farmakologicznej na interwencję terapeutyczną. Idealny biomarker powinien być specyficzny, czuły i łatwo oznaczalny. Uzyskanie materiału do badań powinno być nieinwazyjne, a otrzymane wyniki muszą być powtarzalne [13].

Nowe techniki analityczne wykorzystywane przez współczesną naukę pozwalają na poszukiwanie w moczu markerów uszkodzenia mięśnia sercowego. Ideałem byłoby zidentyfikowanie jednego czułego markera, którego oznaczenie dałoby wyniki łatwe do interpretacji i pozwoliłoby na potwierdzenie schorzenia układu sercowo-naczyniowego.

Prowadzone badania, związane z poszukiwaniem nowych markerów diagnostycznych, ukierunkowane są zarówno na wykrywanie zmian w ekspresji genów (transkryptomika, genomika funkcjonalna), jak i na oznaczanie nowych białek lub innych związków organicznych o niewielkiej masie cząsteczkowej (proteomika, metabolomika, metabonomika), pojawiających się w moczu w procesie chorobowym [14]. Analiza moczu, który jest materiałem łatwym do pobrania, może dostarczyć informacji na temat stanu zaawansowania niewydolności mięśnia sercowego, ocenianego na podstawie zawartości biomarkerów, zanim pojawią się pierwsze symptomy choroby [15]. Mimo szeroko zakrojonych badań nad biomarkerami chorób układu sercowo-naczyniowego nadal nie udało się wyodrębnić pojedynczej substancji, która idealnie służyłaby skonstruowaniu prostego i prognostycznego testu stosowanego w diagnostyce kardiologicznej.

Te ograniczenia i problemy stosowanych metod diagnostycznych skłaniają naukowców i lekarzy do **poszukiwań nowych leków, postawienia właściwej diagnozy i odpowiednie leczenie w oparciu o poznanie podstaw choroby**. Dzięki analizie chorób z homogenymi fenotypami klinicznymi ujawnione zostają różne podtypy choroby, które wymagają odmiennych strategii terapeutycznych. Dostępne narzędzia ułatwiają lekarzom wybierającym lek uwzględnienie indywidualnej zmienności metabolizmu chorego i dzięki temu dobrać farmaceutykę i jego dawki tak, aby uzyskać maksymalną skuteczność leczenia.

Wiedza na temat molekularnych podstaw choroby wpływa na sposób opracowywania nowych leków oraz na strategie badań klinicznych – nie jest to już proces liniowy, a zintegrowany, heurystyczny, obejmujący informacje zwrotne pochodzące z późniejszych etapów badań. Nowe podejście ma łączyć dane molekularne, farmakologiczne i kliniczne pochodzące od pacjenta w jeden „system zarządzania wiedzą” (*knowledge management system*), który będzie ułatwiał zaprojektowanie odpowiedniego leku w odniesieniu do określonego, molekularnego typu choroby [16,17]. Coraz częściej współczesna terapia farmakologiczna w oddziałach chirurgicznych i intensywnej opieki medycznej opiera się na zasadzie „pięciu praw” stosowania leków: „*the right patient, the right drug, the right time, the right dose, and the right route*”. Niezwykle ważnym narzędziem przy optymalizacji leczenia w odniesieniu do konkretnego pacjenta zgodnie z przytoczonymi zasadami, jest zastosowanie technik monitorujących, czyli tzw. **terapii monitorowanej (TM)**, która ma na

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

celu dokładną ocenę stanu klinicznego, pomiar stężenia leku oraz metabolitu w płynach biologicznych [18,19].

Możliwość monitorowania zmian wczesnochorobowych, poprzez poszukiwanie potencjalnych biomarkerów, jak również oznaczanie leków i ich metabolitów w terapii monitorowanej, warunkuje konieczność opracowywania nowych metod oraz ich zastosowania w badaniach próbek biologicznych. Leki i metabolity, a także związki endogenne o niewielkiej masie cząsteczkowej, które mogą być potencjalnymi markerami chorób sercowo-naczyniowych występują w płynach ustrojowych w stężeniach rzędu mikrogramów do miligramów na liter. Dla potrzeb ich oznaczania w skomplikowanych matrycach próbek rzeczywistych zastosowane muszą być metody analityczne o odpowiedniej czułości, dokładności, powtarzalności i selektywności. Ponadto metodyka oznaczeń we wczesnej diagnostyce medycznej oraz w terapeutycznym monitorowaniu leków powinna zapewniać krótki czas oczekiwania na wynik (*turn-around time*, TAT) [20].

Dla potrzeb analityki biomedycznej najczęściej stosuje się techniki chromatograficzne sprzężone ze spektroskopowymi oraz immunochemiczne. Z technik separacyjnych i spektralnych najczęściej stosowana jest chromatografia cieczowa (LC) oraz chromatografia gazowa (GC) w połączeniu z różnymi detektorami (spektrofotometrycznym, fluorescencyjnym, elektrochemicznym oraz ze spektrometrem mas). Ważną zaletą metod chromatograficznych jest możliwość jednoczesnego oznaczenia różnych leków i ewentualnych ich metabolitów w próbce tego samego materiału biologicznego. Natomiast w metodach immunochemicznych metabolity leków z jednej strony mogą pogarszać swoistość analityczną przy oznaczeniach leków, a z drugiej strony wymagane są odrębne przeciwciała do ich oznaczania [21–25].

Ze względu na wymogi metodyczne i aparaturowe, do niedawna techniki chromatograficzne stosowane były częściej dla celów naukowo-badawczych. Warto podkreślić zmiany, jakie dokonały się na przestrzeni ostatnich lat, w kierunku rozwoju metod rozdzielczych. Doprowadziły one do wprowadzenia w 2004 roku nowych systemów chromatograficznych – UHPLC, wyposażonych w kolumny analityczne o średnicy ziaren 1,7 μm . Na podstawie publikacji z zakresu chromatografii cieczowej można zauważyć, że systemy UHPLC zaczynają powoli wypierać standardowe systemy HPLC [26–29]. **Znaczne skrócenie czasu analizy, a przez to zasadnicze zmniejszenie jej kosztów, sprawia iż technika UHPLC jest coraz częściej stosowana w branży farmaceutycznej, a także w laboratoriach diagnostycznych.**

W badaniach bioanalitycznych obserwuje się również dynamiczny rozwój technik izolacji analitów z próbek o złożonych matrycach. Zmierzają one głównie do miniaturyzacji i automatyzacji procesu przygotowania próbki, zmniejszenia czaso- i pracochłonności, obniżenia granicy oznaczalności oraz eliminowania lub minimalizowania ilości zużywanych rozpuszczalników. W tym celu tak powszechnie dotychczas stosowane metody izolacji zastępowane są przez nowe techniki, pozwalające na izolację analitów z próbki do stałego sorbentu lub bezpośrednio do fazy ciekłej. Wśród nich należy wymienić takie techniki, jak: mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu (MEPS), mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME), mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika przez emulgację wspomaganą mikrofalami (USAEME) oraz mikroekstrakcja do kropli (SDME) [30–34].

Cel badań realizowanych w ramach habilitacji

Celem moich badań naukowych, opisanych w pracach zgłoszonych do postępowania habilitacyjnego [H1–H11], było opracowanie i optymalizacja metod izolacji oraz oznaczania leków, ich metabolitów i biomarkerów, w oparciu o nowoczesne, efektywne techniki ekstrakcyjne, rozdzielcze i spektralne. Inspiracją do badań realizowanych w ramach rozprawy habilitacyjnej były przesłanki literaturowe na temat zmiany poziomu stężeń L-karnityny i jej pochodnych oraz kwasu α -ketoglutazarowego w płynach biologicznych w zależności od stanu zdrowia pacjentów. Z drugiej strony potrzeba kontroli stężenia leków i ich metabolitów w rzeczywistym czasie leczenia jest jedną z najefektywniejszych metod personalizacji terapii uwzględniającej indywidualne cechy pacjenta oraz ewentualne oddziaływania farmaceutyków z innymi związkami. Wielość oznaczanych związków, złożony skład matryc oraz wymagane niskie granice oznaczalności powodują, że brakuje w dziedzinie analityki medycznej odpowiednich procedur analitycznych. Stąd istotną motywacją podjęcia opisanej powyżej tematyki badawczej, była **potrzeba opracowania narzędzi analitycznych dla wczesnej diagnostyki medycznej, a także do monitorowanej terapii.**

Mając na uwadze powyższe zagadnienia podjęłam badania naukowe w poniżej wymienionych kierunkach:

1. Badania różnych metodyk przygotowania próbek pod kątem ich zastosowania do efektywnej ekstrakcji L-karnityny i jej estrowych pochodnych, kwasu α -ketoglutazarowego oraz leków należących do różnych grup terapeutycznych i ich metabolitów z płynów ustrojowych i z tkanek ryb [H1–H3, H5–H11] [35–37, 39–45].
2. Dobór warunków rozdzielania i parametrów detekcji potencjalnych biomarkerów chorób sercowo-naczyniowych oraz leków i ich metabolitów [H1–H11] [35–45].
3. Weryfikacja opracowanych metodyk przez przeprowadzenie oznaczeń w próbkach materiału pobranego od pacjentów, którym podawano wybrane leki w dawkach terapeutycznych oraz od osób ze zdiagnozowanymi schorzeniami układu krążenia [H1–H9, H11] [35–43, 45].

Zastosowanie nowoczesnych technik ekstrakcyjnych w badaniach nad przygotowaniem próbek biologicznych

Jedną z głównych idei prac H1–H3, H5–H11 było opracowanie prostych, stosunkowo szybkich i tanich, a także ekologicznych metod ekstrakcji wybranych związków, które mogą być potencjalnymi biomarkerami chorób sercowo-naczyniowych oraz farmaceutyków, w tym leków nowej generacji stosowanych w kardiologii i ich metabolitów [35–37, 39–45].

W celu izolacji leków i ich metabolitów oraz wybranych związków endogennych, wykorzystuje się obecnie zarówno klasyczne, jak i nowoczesne metody ekstrakcji. Równocześnie jednak zauważalny jest brak publikacji naukowych ukierunkowanych na systematyczną analizę, dobór parametrów wpływających na odzysk analitów i porównanie efektywności różnorodnych technik ekstrakcji. Jest to ważny problem szczególnie w poszukiwaniu nowych biomarkerów oraz w badaniach metabolizmu leków, gdzie zastosowana metoda przygotowania próbek powinna prowadzić do uzyskania ekstraktów maksymalnie odzwierciedlających profil jakościowy i stężenie analitów zawartych w materiale biologicznym. Z tego względu jedynie wykorzystanie zoptymalizowanych procedur

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

analitycznych pozwala przeprowadzić właściwą analizę jakościową i ilościową związków zawartych w ekstraktach płynów biologicznych i gwarantuje formułowanie wiarygodnych wniosków na podstawie uzyskanych wyników badań.

Pierwszym etapem prowadzonych przeze mnie badań było opracowanie metod izolacji i wzbogacania analitów z próbek moczu oraz osocza pobranych od pacjentów m.in. ze schorzeniami kardiologicznymi. Ze względu na skomplikowany charakter matrycy biologicznej (mocz, osocza) bezpośrednie oznaczanie analitów okazało się praktycznie niemożliwe. Konieczne było usunięcie jak największej ilości potencjalnie interferujących składników. Ponadto poziomy stężenie leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych są z reguły niskie, dlatego do ich ilościowego oznaczania zastosowałam odpowiednie procedury wzbogacania analitu. Wobec braku dostępnych CRM, analizy przeprowadzałam przy użyciu próbek biologicznych wzbogaconych w znane, ściśle określone ilości oznaczanych substancji. Stopień efektywności ekstrakcji analitów z próbki oraz oczyszczenie ekstraktów oceniałam porównując wielkości sygnałów pochodzących z prób kontrolnych (ślepych) oraz prób wzbogaconych substancjami wzorcowymi.

Wysokosprawne techniki separacyjne wymagają z reguły usunięcia substancji interferujących przed wykonaniem oznaczeń. Stąd w badaniach koncentrowałam się na stosowaniu technik ekstrakcyjnych opartych między innymi na mechanizmach sorpcji w zastosowaniu do izolacji z moczu oraz z osocza skomplikowanych mieszanin związków o różnych właściwościach fizyko-chemicznych. W tym celu opracowałam dla badanych mieszanin związków procedury ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [H1, H5] [35,39], mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu (MEPS) [H2, H3, H6, H8, H9] [36,37,40,42,43], mikroekstrakcji kroplą rozpuszczalnika przez emulgację wspomaganą ultradźwiękami (USAEME) [H7] [41], ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz wspomaganą wysalaniem (SALLE) [H11] [45].

Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

Badania nad opracowaniem metodyki izolacji leków oraz potencjalnych biomarkerów z próbek biologicznych z zastosowaniem SPE obejmowały m.in. dobór odpowiedniego sorbentu ekstrakcyjnego, rozpuszczalnika do elucji analitów, pH oraz objętości próbki. Ekstrakcję SPE prowadziłam na sorbentach krzemionkowych oraz polimerowych (pochodzących od różnych producentów, o różnym rodzaju wypełnienia, masie oraz objętości) w klasycznym układzie SPE, gdzie sorbent umieszczony był w kolumnie polipropylenowej. W zależności od zastosowanego wypełnienia uzyskałam różną efektywność, selektywność i powtarzalność ekstrakcji w stosunku do wybranych do badań leków oraz potencjalnych markerów niewydolności mięśnia sercowego.

Wyniki badań jakie uzyskałam dla 17 sorbentów SPE (11 sorbentów otrzymanych na bazie modyfikowanej krzemionki oraz 6 sorbentów polimerowych) oraz 13 leków (aliskiren, prasugrel, riwaroksaban, prednizolon, propranolol, ketoprofen, nifedypina, naproksen, terbinafina, ibuprofen, diklofenak, sildenafil, acenokumarol) zostały zebrane i omówione w pracy H5 [39]. W pracy tej badałam przydatność zarówno klasycznych (oktadecylowych, fenylowych), jak i nowych (SDB, Oasis HLB) adsorbentów zastosowanych na etapie izolacji wyżej wymienionych leków z próbek moczu. Wynikiem moich badań było wskazanie kilku ważnych różnic we właściwościach każdego z testowanych adsorbentów. Otrzymane rezultaty pozwoliły mi stwierdzić, że dla wybranych leków procent odzysku maleje wraz ze wzrostem polarności sorbentu. Efekt ten jest konsekwencją występowania różnego rodzaju oddziaływań w układzie analit-sorbent. Dla sorbentów polarnych (krzemionka modyfikowana

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

grupami diolowymi, aminowymi, cyjanowymi) siłami warunkującymi oddziaływania między analitem a sorbentem, są wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol. Gdy zastosowałam sorbenty z chemicznie związanymi grupami niepolarnymi (C2, C8, C18) oddziaływania zachodziły na zasadzie sił dyspersyjnych (van der Waalsa), co wpłynęło na wzrost odzysku ekstrahowanych związków o właściwościach średniopólnych. Równocześnie hydrofobowe oddziaływania alkilowych łańcuchów C18 z niepolarnymi lekami zakłócały ich proces desorpcji z sorbentu oktadecylowego, dlatego ulegały one silniejszej retencji w porównaniu do ich ekstrakcji na sorbentach średniopólnych. Innym problemem, jaki zaobserwowałam, była silniejsza retencja leków na sorbentach polimerowych: Oasis[®] HLB (kopolimer styrenu, diwinylobenzenu i N-winylopirolidonu – PS-DVB-NVP) i SDB (kopolimer styrenu, diwinylobenzenu i etylowinylobenzenu – PS-DVB-EVB). Efekt ten potwierdziłam dla wszystkich farmaceutyków i powiązałam go z bardzo dużą powierzchnią właściwą tych adsorbentów, około 800 m²/g i > 1000 m²/g, odpowiednio dla Oasis[®] HLB i SDB. Dodatkowo, zwiększona retencja analitów na sorbencie Oasis[®] HLB, może wynikać z obecności grup pirolidynowych, mających charakter akceptorów jonu wodorowego. Wysokie odzyski dla leków uzyskałam stosując kolumnienki ekstrakcyjne firmy BAKERBOND (średni odzysk 80%), których wypełnienie stanowił żel krzemionkowy aktywowany grupami fenyłowymi. W publikacji **H5** dowiodłam, że sorbent ten ma nieco inną selektywność w porównaniu z tradycyjnymi niepolarnymi sorbentami. W przypadku wypełnień fenyłowych głównym mechanizmem retencji są oddziaływania van der Waalsa oraz oddziaływania typu π - π , które powstają między aromatycznym pierścieniem obecnym w strukturze badanych farmaceutyków oraz grupami fenyłowymi w sorbencie [39]. Podsumowując wszystkie uzyskane wyniki, postawiłam tezę, że w grupie testowanych sorbentów, najlepszą efektywność ekstrakcji analitów otrzymałam dla sorbentu z grupą fenyłową. Wykorzystując to wypełnienie, odzyski dla ekstrahowanych leków były bliskie lub równe 100%, a ekstrakty poddawane dalszej analizie UHPLC-UV były dobrze oczyszczone z substancji interferujących. W literaturze opisane są procedury ekstrakcji leków będących przedmiotem badań, jednakże dedykowane są one głównie do ekstrakcji pojedynczych związków z płynów biologicznych. *Nowatorstwo, a zarazem trudność opracowanej metodyki, wiązała się z koniecznością równoczesnej izolacji związków o zróżnicowanej polarności z zastosowaniem jednej, optymalnej procedury SPE. Uzyskane wyniki mogą stanowić bazę danych przy wstępnym wyborze sorbentów do ekstrakcji zarówno farmaceutyków nowej generacji (aliskiren, prasugrel, riwaroksaban), jak i powszechnie stosowanych leków dostępnych bez recepty (np. ibuprofen, naproksen) z płynów biologicznych. Jest to po raz pierwszy opisana w literaturze naukowej metoda SPE umożliwiająca wydajną ekstrakcję z moczu trzynastu farmaceutyków o różnych typach struktur i polarnościach* [39].

Wpływ rodzaju sorbentu badałam także w przypadku ekstrakcji L-karnityny oraz acetylo-L-karnityny z próbek moczu [**H1**] [35]. Poza hydrofilowymi, hydrofobowymi i polimerowymi sorbentami, wykorzystałam także wymiennicze jonowe, a spodziewanym efektem był wzrost efektywności ekstrakcji L-karnityny oraz acetylo-L-karnityny. Na podstawie otrzymanych wyników do izolacji tych *N,N,N*-trimetylowych pochodnych kwasu γ -amino- β -hydroksymasłowego spośród przetestowanych sorbentów wybrałam wymiennicze jonowe – czwartorzędowe sole amoniowe. W przypadku L-karnityny oraz acetylo-L-karnityny na proces ich zatrzymywania na powierzchni sorbentu wpływ mają przede wszystkim oddziaływania hydrofobowe oraz jonowe, pomiędzy ujemnie naładowanymi grupami karboksylowymi w cząsteczkach analitów a protonowanymi grupami aminowymi. Jak przedstawiłam w pracy **H1**, na sorbentach jonowymiennych otrzymałam wysokie odzyski dla oznaczanych związków [35]. Dotychczas odzyski uzyskane dla procedur opisanych

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

w literaturze mieściły się w zakresie od 75% do 76% [46], podczas gdy w przypadku opracowanej przez mnie procedury wynosiły od 86% do 99% [35]. *Jest to dobry wynik, w porównaniu z danymi prezentowanymi w literaturze.* Badania efektywności ekstrakcji wykonałam także dla kwasu α -ketoglutarynowego. Ze względu na odmienność chemiczną L-karnityny i kwasu α -ketoglutarynowego konieczne było zastosowanie nieco innych warunków przygotowania próbek do analizy [H1]. Najlepszym sorbentem do izolacji tego kwasu okazał się żel krzemionkowy. Współczynnik podziału oktanol-woda dla tego związku wynosi $\log P=0,05$. Mechanizm retencji hydrofilowego kwasu α -ketoglutarynowego na żelu krzemionkowym związany był z tworzeniem wiązań wodorowych i z występowaniem oddziaływań dipol-dipol [35].

Mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu

W następnych latach pogłębiałam tematykę związaną z zastosowaniem mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu (MEPS) do izolacji leków i ich metabolitów [H2, H3, H6, H8] oraz L-karnityny i jej pochodnych [H9] [36,37,40,42,43]. Znalazło to odzwierciedlenie w kolejnych opublikowanych pracach, w których sprawdzałam wpływ najważniejszych parametrów ekstrakcji na jej efektywność. Badania nad doбором warunków mikroekstrakcji prowadziłam zarówno w tradycyjny sposób [H3, H6, H8, H9], jak i z zastosowaniem odpowiednich metod chemometrycznych [H2].

Mikroekstrakcję do upakowanego sorbentu wykorzystywałam do izolacji niesteroidowych leków przeciwzapalnych (ketoprofenu, naproksenu, ibuprofenu, diklofenaku, kwasu acetylosalicylowego i jego metabolitu – kwasu salicylowego) [H2] [36], leków nowej generacji stosowanych w kardiologii (riwaroksabanu, aliskirenu oraz prasugrelu) [H3] [37], leków z różnych grup terapeutycznych (milrinonu, enalaprilu, karwedilolu, spironolaktonu, acenokumarolu, tiklopidyny, cilazaprilu) i ich metabolitów (2-okstiklopidyny, cilazaprilatu, kanrenonu, 5'-hydroksykarwedilolu, O-desmetylokarwedilolu, enalaprilatu) [H6] [40], dwóch leków i aktywnego metabolitu, których równoczesne stosowanie może powodować niebezpieczne interakcje (aliskirenu, enalaprilu i enalaprilatu) [H8] [42], L-karnityny i jej estrowych pochodnych (acetylokarnityny, propionylkarnityny, heksanylokarnityny, oktanylokarnityny, dekanylokarnityny, lauronylokarnityny, myristonylokarnityny, palmitonylokarnityny) [H9] [43].

W ramach przeprowadzonych eksperymentów badałam wpływ rodzaju sorbentu, rodzaj, pH i objętość rozpuszczalnika do elucji, pH i objętość próbki, liczbę cykli ekstrakcyjnych oraz rodzaj rozpuszczalnika do przemywania złoża ekstrakcyjnego.

W publikacji H3 wykazałam, że na selektywność ekstrakcji nowych leków kardiologicznych największy wpływ ma odpowiedni dobór złoża ekstrakcyjnego. Najlepszy odzysk dla wszystkich farmaceutyków uzyskałam po zastosowaniu krzemionki modyfikowanej grupą oktylową (C8), jako sorbentu oraz metanolu, jako rozpuszczalnika elującego [37]. Mechanizm retencji oparty jest głównie o oddziaływania hydrofobowe występujące pomiędzy analitami i wybranym sorbentem oraz o wtórne oddziaływania, takie jak wiązania wodorowe oraz oddziaływania dipol-dipol. W pracy H3 wykazałam również, że wpływ na efektywność ekstrakcji wybranych związków ma pH próbki, im wyższe pH tym wyższy odzysk analitów. W literaturze istnieją tylko pojedyncze prace dotyczące izolacji badanych leków z płynów biologicznych, przy czym wszystkie zakładają zastosowanie tradycyjnej techniki SPE [47,48] lub jedynie wytrącanie białek [49].

Procedurę opisaną w publikacji H3 i zastosowaną do ekstrakcji aliskirenu, prasugrelu i riwaroksabanu wykorzystywałam również do przygotowania próbek moczu i osocza przed

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

analizą UHPLC-MS/MS innej mieszaniny związków, tj. aliskirenu, enalaprilu oraz jego aktywnego metabolitu – enalapirylatu [H8]. Dane zawarte w publikacji H8 wskazują, że mikroekstrakcja w warunkach opisanych w publikacji H3 jest również odpowiednia do izolacji enalaprilu i jego metabolitu [42]. W przypadku badań nad opracowaniem procedury przygotowania próbki opisanej w pracy H3 zastosowałam manualny (*off-line*) tryb ekstrakcji MEPS [37], natomiast w pracy H8 mechaniczny, przy użyciu pompy eVol[®]XR [42]. Nie zaobserwowałam znaczącej poprawy parametrów ekstrakcji (odzysk, RSD), a jedynie żywotność sorbentów BIN[®] zwiększyła się przy zastosowaniu pompy, co pozwoliło obniżyć koszty ekstrakcji.

Kontynuując badania nad zastosowaniem mikroekstrakcji MEPS w układach bioanalitycznych podjęłam również próbę opracowania procedury do równoczesnej izolacji leków z kilku grup terapeutycznych oraz ich metabolitów z próbek moczu [H6]. Podobnie jak we wcześniejszych pracach przebadalam trzy sorbenty na bazie krzemionki (C2, C8 oraz C18). Dla mieszaniny 13 związków o różnych właściwościach chemicznych sorbent z wypełnieniem oktadecylowym okazał się być najlepszym pod względem otrzymanych odzysków i pod względem stopnia oczyszczenia matrycy z substancji interferujących [40]. Dobór rozpuszczalnika użytego do elucji (mieszanina acetonitryl:metanol; 50:50; v/v), pozwolił na uzyskanie dobrej wydajności ekstrakcji wszystkich analitów (odzyski wyższe od 70%). W literaturze nie ma informacji na temat zastosowania techniki MEPS do izolacji związków będących przedmiotem prowadzonych przeze mnie badań. Autorzy stosują jedynie tradycyjną ekstrakcję SPE, najczęściej do izolacji pojedynczych związków. Opracowana i opisana w publikacji H6 procedura MEPS umożliwia uzyskanie porównywalnych lub lepszych wyników w stosunku do prezentowanych dotychczas w literaturze [50–52]. Osiągnięciem w tych badaniach jest nie tylko wysoka wydajność ekstrakcji MEPS, ale również skuteczne usunięcie interferentów, co umożliwiło zastosowanie jej do oznaczenia analitów w płynach biologicznych za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z mniej selektywnym od spektrometru mas, detektorem spektrofotometrycznym UV [40].

Poza izolacją leków i ich metabolitów do badań efektywności mikroekstrakcji MEPS wykorzystałam także inną grupę związków – L-karnitynę i jej estrowe pochodne [H9]. W tym celu zastosowałam dwa rodzaje sorbentów, krzemionkę modyfikowaną grupą etylową (C2) do ekstrakcji myristonylokarnityny, palmitonylokarnityny oraz sorbent M1 (C8+SCX) do ekstrakcji L-karnityny i jej pozostałych pochodnych [43]. Mechanizm retencji analitów, dla których zastosowałam wypełnienie M1 ma złożony charakter, oparty zarówno na oddziaływaniach hydrofobowych, jak i wymianie jonowej. Na etapie desorpcji jako rozpuszczalnik eluujący użyłam acetonitryl z dodatkiem amoniaku. Jednakże amoniak powodował hydrolizę acetylokarnityn, dlatego do badań wybrałam pirydynę. Odzysk analitów mieścił się w zakresie od 70% do 110%. Są to wyniki zbliżone [53] lub lepsze od uzyskiwanych do tej pory przez innych badaczy, którzy stosowali inne techniki przygotowania próbek [54,55]. Dane otrzymane w czasie prowadzonych eksperymentów i zaprezentowane w pracy H9 dowodzą, iż zastosowanie mikroekstrakcji jest bardzo dobrym rozwiązaniem metodycznym do izolacji wybranych związków endogennych. Z danych literaturowych wynika, że technika MEPS jest używana głównie do izolacji leków z płynów biologicznych. *W pracy H9 technika MEPS po raz pierwszy została zastosowana do ekstrakcji L-karnityny i jej estrowych pochodnych z próbek moczu. Opracowana procedura charakteryzuje się dużą selektywnością, ponieważ nie obserwowałam interferencji pochodzących od składników matrycy na sygnały analityczne oznaczanych związków. Podkreślić należy, że do przygotowania jednej próbki wymagane jest użycie jedynie 400 μ L rozpuszczalnika*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

organicznego, a całkowity czas ekstrakcji to ok. 3 min. W publikacji H9 pokazałam, że technika MEPS może zastąpić powszechnie stosowaną ekstrakcję SPE lub może być stosowana jako porównawcza dla tej metody [43].

Dalsze badania doprowadziły do zastosowania analizy statystycznej, jako narzędzia stwarzającego możliwość nowego podejścia do doboru warunków mikroekstrakcji niesteroidowych leków przeciwzapalnych (ibuprofen, ketoprofen, dikofenak, aspiryna, naproksen, kwas salicylowy) z próbek moczu [H2] [36]. W celu selekcji parametrów ekstrakcji, które w sposób istotny wpływały na odzysk badanych leków zastosowano plan eliminacyjny Plackett-Burman. Na etapie doboru warunków MEPS przygotowano plan zakładający wykonanie jedenastu eksperymentów w celu optymalizacji siedmiu najważniejszych parametrów ekstrakcji (rodzaj, pH i objętość rozpuszczalnika do elucji, pH i objętość próbki, czas suszenia złoża, zawartość metanolu w rozpuszczalniku stosowanym do przemywania złoża ekstrakcyjnego). Otrzymane wyniki poddano analizie czynników głównych (PCA; *principal components analysis*) oraz analizie skupień (CA; *cluster analysis*), co umożliwiło mi określenie najlepszych warunków przygotowania próbki. W oparciu o uzyskane rezultaty, wnioskowałam, iż najbardziej korzystnym rozwiązaniem jest zastosowanie do ekstrakcji sorbentu C18, natomiast najlepszym rozpuszczalnikiem do elucji analitów ze złoża był acetonitryl. Otrzymane odzyski związków były wyższe niż 80% na wszystkich poziomach fortyfikacji, dzięki czemu możliwe było zastosowanie opracowanej procedury ekstrakcji MEPS w dalszych etapach badań [36]. Użycie planu Placketta-Burman, pozwoliło na uzyskanie wiarygodnych wyników, przy znacznym zmniejszeniu liczby badanych warunków doświadczalnych w porównaniu do tradycyjnych procedur [56]. W publikacji H2 pokazałam dodatkową zaletę zastosowania metod statystycznych w planowaniu eksperymentu, a mianowicie określenie zależności między dobieranymi parametrami ekstrakcji i równoczesnego wpływu poszczególnych zmiennych na wynik analizy [36]. Badania udowodniły, że analiza PCA, którą zastosowałam po raz pierwszy do optymalizacji warunków mikroekstrakcji badanych leków jest doskonałym narzędziem ułatwiającym dokonanie właściwego wyboru warunków izolacji analitów z próbek rzeczywistych [H2].

Uzyskane wyniki [H2, H3, H6, H8, H9] potwierdzają po raz pierwszy, że zastosowanie MEPS prowadzi do efektywnej ekstrakcji szerokiej grupy leków i ich metabolitów, L-karnityny i jej estrowych pochodnych, do skrócenia i uproszczenia procedury w porównaniu do dotychczas stosowanych procedur SPE [57]. Ponadto poprzez dobór warunków mikroekstrakcji MEPS opracowałam metodyki, które pozwoliły na dobre oczyszczenie ekstraktów płynów biologicznych z substancji interferujących. Opracowane metody oparte na wykorzystywaniu procedury MEPS w połączeniu z szeroko dostępnym sposobem detekcji UV lub bardziej selektywnym MS/MS, posiadają duży potencjał aplikacyjny w analizie jakościowej i ilościowej związków będących przedmiotem niniejszych badań. Cechy tych opracowanych procedur sprawiły, iż izolacja analitów stała się bardzo szybka, łatwa do przeprowadzenia i ekonomiczna. Ta charakterystyka wskazuje, iż można je zaliczyć do nurtu „zielonej chemii”.

Mikroekstrakcja przez emulgację kroplą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami

Mikroekstrakcję jednostopniową USAEME rozpuszczalnikami organicznymi zastosowałam do izolacji z próbek moczu ibuprofenu oraz jego metabolitów (1-hydroksyibuprofenu, 2-hydroksyibuprofenu, 3-hydroksyibuprofenu, karboksyibuprofenu) [H7]. W pierwszym etapie opracowywania nowej procedury dokonałam wyboru

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

rozpuszczalnika, kierując się kryterium wymagań stawianych ekstrahentom. Wyniki, jakie zestawiałam i omówiałam w pracy **H7** świadczą o tym, że najlepszą efektywność ekstrakcji uzyskałam po zastosowaniu 1-oktanolu [41]. Efekt ten jest konsekwencją oddziaływań między analitami a rozpuszczalnikiem ekstrahującym o charakterze dipol-dipol, dyspersyjnych, bądź też typu wiązania wodorowego. Ponadto wybór tego rozpuszczalnika podyktowany był jego stosunkowo niską rozpuszczalnością w wodzie, dużą lepkością i małą lotnością. Kolejnym istotnym elementem opracowania metody ekstrakcji był dobór objętości rozpuszczalnika. Powszechnie wiadomo, że zwiększenie ilości rozpuszczalnika prowadzi do zwiększenia odzysku analitów z fazy wodnej – analogicznie jak w ekstrakcji ciecz-ciecz. Należy jednak zwrócić uwagę, że zwiększenie objętości rozpuszczalnika ekstrahującego prowadzi równocześnie do zwiększenia objętości ekstraktu. Oznacza to, że po przekroczeniu pewnej optymalnej objętości rozpuszczalnika ekstrahującego warunki prowadzenia ekstrakcji mogą już nie zapewniać uzyskania odpowiednio korzystnego współczynnika wzbogacenia analitu. W prowadzonych przeze mnie badaniach z wykorzystaniem techniki USAEME obserwowałam wyżej opisany efekt wzrostu odzysku analitów wraz ze wzrostem objętości rozpuszczalnika ekstrahującego do 100 μ L 1-oktanolu [**H7**]. Zbyt mała objętość ekstrahenta nie pozwoliła na uzyskanie odpowiedniego stopnia zdyspergowania rozpuszczalnika, co skutkowało niskim odzyskiem analitów. Większa objętość nie powodowała wzrostu efektywności ekstrakcji, a jedynie obniżenie współczynnika wzbogacenia analitów. W ramach prowadzonych badań określiłam również wpływ wzrostu siły jonowej roztworu oraz zmiany pH na wydajność ekstrakcji [41]. O ile wpływ zmiany siły jonowej w technice USAEME na odzysk analitów nie zawsze jest możliwy do przewidzenia, o tyle wpływ pH dla związków o wyraźnym charakterze zasadowym lub kwasowym wstępnie oszacowałam przed wykonaniem eksperymentu. Na podstawie przeprowadzonych badań wybrałam pH próbki równe 2,5. Przy niskich wartościach pH jonizacja analitów była hamowana, zatem występowały one w próbce w postaci obojętnej, co zdecydowanie ułatwiało ich przejście z warstwy wodnej do rozpuszczalnika organicznego. Dodatek soli do próbki moczu powodował zmniejszenie rozpuszczalności analitów w roztworze wodnym (a tym samym zwiększenie współczynnika podziału rozpuszczalnik/woda), zwiększając przenoszenie masy analitów do ekstrahenta, a tym samym wpłynął na wzrost odzysków. Zaobserwowałam również, że zbyt wysokie stężenie soli powoduje spadek efektywności ekstrakcji, co może wynikać ze zmiany fizycznych właściwości dyfuzyjnej warstwy roztworu i ze spowolnienia przebiegu procesu ekstrakcji. Ponadto wraz ze wzrostem lepkości i gęstości próbki, w wyniku dodania zbyt dużej ilości soli, promieniowanie ultradźwiękowe mogło zostać pochłonięte i rozproszone w postaci ciepła.

*W publikacji **H7** po raz pierwszy opisałam zastosowanie techniki USAEME do izolacji ibuprofenu i jego metabolitów z próbek moczu. Uważam, że opracowana procedura USAEME jest łatwa do wykorzystania w ekstrakcji analitów z próbek biologicznych i może być alternatywą do szeroko stosowanej tradycyjnej ekstrakcji typu ciecz-ciecz (LLE). Porównanie opracowanej procedury mikroekstrakcji oraz oznaczania ibuprofenu i jego metabolitów z innymi opisanymi dotychczas w literaturze zamieściłam w formie tabeli w pracy **H7** [41].*

Ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz wspomagana wysalaniem

Innym rozwiązaniem metodycznym, które zastosowałam w badaniach nad izolacją β -blokerów i ich metabolitów była ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz wspomagana wysalaniem [**H10**]. W ramach pracy określiłam wpływ rodzaju oraz objętości rozpuszczalnika

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

organicznego, rodzaj oraz ilości związku wysalającego, pH próbki i czasu wytrząsania. W przypadku zastosowania do ekstrakcji metanolu i etanolu nie uzyskałam rozdzielania faz po dodaniu soli [45]. Dobre rozdzielanie warstw, wysokie odzyski oraz współczynnik wzbogacenia uzyskałam po zastosowaniu 300 μ L acetonitrylu. W przypadku izopropanolu warstwa pobrana do analizy zawierała nadal pewną ilość wody, co spowodowało znaczne skrócenie czasów retencji oraz pogorszenie kształtu pików w warunkach chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) (woda ma dużą moc elucji w układzie HILIC). Ponadto oznaczane związki charakteryzują się słabą rozpuszczalnością w izopropanolu, dlatego pomimo zastosowania wysalania odzysk analitów był niski. Kolejno w ramach badań sprawdziłam wpływ pięciu soli nieorganicznych: chlorku sodu, chlorku potasu, chlorku amonu, siarczanu amonu i siarczanu magnezu. Chlorki amonu i potasu wykazywały najslabsze właściwości wysalające, dlatego warstwa rozpuszczalnika organicznego po ekstrakcji była bardzo mała. Te dwie sole można zaliczyć do związków chaotropowych – osłabiających oddziaływanie hydrofobowe, a tym samym zwiększających rozpuszczalność analitów w wodzie i zmniejszając ich odzysk. Lepsze właściwości wysalające wykazywał chlorek sodu, dlatego warstwa ekstraktu dla tej soli była dwukrotnie większa. Dla chlorku sodu odzysk analitów był również wyższy. Sole zawierające aniony siarczanowe wykazują właściwości kosmotropowe, zmniejszając powierzchnię kontaktu pomiędzy cząsteczkami wody a analitami, co sprzyjało ekstrakcji do fazy organicznej. Silny efekt wysalający skutkowało zwiększeniem objętości (250 μ L dla siarczanu amonu i 300 μ L dla siarczanu magnezu). W badaniach stosowałam sole o stężeniu 300 mg/mL, co mogło spowodować nieznacznie niższy odzysk w przypadku zastosowania soli magnezowej. Stężenie siarczanu magnezu w warstwie wodnej było zbliżone do roztworu nasyconego, co z kolei skutkowało zwiększeniem lepkości warstwy wodnej, utrudniało wymianę masy i wpływało na niższą efektywność ekstrakcji. Ponadto ze względu na dużą objętość warstwy organicznej współczynnik wzbogacenia był mniejszy niż w przypadku stosowania soli amonowej. Dla siarczanu amonu uzyskałam zadowalający współczynnik wzbogacenia, równocześnie z bardzo wysokim odzyskiem analitów [H10]. Ponadto rozpuszczalność siarczanu amonu w wodzie jest dwukrotnie większa niż pozostałych soli, co pozwoliło na uzyskanie dobrego rozdzielania warstw przy mniejszym zużyciu soli. Dzięki znakomitym właściwościom wysalającym otrzymałam wysokie odzyski nawet dla najlepiej rozpuszczalnych w wodzie β -blokerów (metoprololu i propranololu). W ramach prowadzonych badań określiłam również wpływ pH próbki moczu na efektywność ekstrakcji [45]. Wybrane β -blokerzy są związkami o charakterze zasadowym, o pK_a odpowiednio 8,74 dla karwedilolu, 9,42 dla propranololu i 9,67 dla metoprololu. Przy pH powyżej tych wartości występują w formie niezjonizowanej i jako mniej hydrofilowe wykazują większe powinowactwo do fazy organicznej. Przy wartościach pH=10 i pH=11 odzysk wszystkich β -blokerów był wyższy niż 80%, natomiast przy pH 12 zbliżony do 100%. Przy pH=12 w próbce występowały wyłącznie β -blokerzy w postaci niezjonizowanej, a wraz z obniżaniem pH pojawiały się formy sprotonowane. Przy wartościach pH poniżej pK_a odzysk analitów spadał, ponieważ zaczynała dominować forma hydrofilowa analitów. Przy niskim pH odzysk wszystkich β -blokerów był niższy niż 20%.

Zastosowanie SALLE pozwoliło na bardzo dobre oczyszczenie matrycy. Żaden związek obecny w matrycy nie interferował z analitami. Uzyskałam wysoki odzysk wszystkich analitów (wyższy niż 85%), przy zachowaniu krótkiego czasu całej procedury przygotowania próbki. Użycie do ekstrakcji małych objętości rozpuszczalnika zdecydowanie zmniejszyło ilość generowanych odpadów, a ponadto pozwoliło na znaczne skrócenie procesu przygotowania próbki. Objętość rozpuszczalnika ekstrahującego mniejsza niż 1 mL opisano

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

w trzech publikacjach [58–60], jednak tylko w jednym przypadku [60] czas ekstrakcji jest krótszy niż zaproponowany w mojej pracy [H11].

Zastosowanie nowoczesnych technik separacyjnych i spektralnych w badaniach nad oznaczaniem potencjalnych biomarkerów, leków oraz ich metabolitów

Celem moich badań było opracowanie metodyk umożliwiających jednoczesne oznaczanie potencjalnych markerów chorób sercowo-naczyniowych, leków i ich metabolitów w płynach fizjologicznych oraz selektywne ich rozdzielenie od składników matrycy. Swoje zainteresowania nad wykorzystaniem technik chromatograficznych (HPLC oraz UHPLC) sprzężonych z metodami spektroskopowymi (UV oraz MS/MS) skierowałem na złożoną pod względem strukturalnym grupę związków, do których należały L-karnityna i jej estrowe pochodne oraz kwas α -ketoglutaryny [H1, H9] [35,43], leki [H2, H4, H11] [36,38,45], w tym leki nowej generacji stosowane w kardiologii [H3, H5] [37,39], leki i ich metabolity [H6, H7, H8, H11] [40,41,42,45]. Szczególnym wyzwaniem było podjęcie się opracowania metod, które pozwalają na oznaczanie w jednym cyklu pomiarowym dużej liczby analitów, a przy tym charakteryzują się wysoką czułością i dobrą selektywnością oznaczeń oraz krótkim czasem analizy. *Warto dodać, że w literaturze naukowej brakuje podejścia badawczego obejmującego wykorzystanie technik rozdzielczych i spektralnych w równoczesnym oznaczaniu wymienionych grup związków.*

Dobór warunków detekcji

We wstępnym etapie prowadzonych badań stosowałam detekcję spektrofotometryczną UV, a identyfikację wybranych związków prowadziłam w oparciu o czasy retencji oraz poprzez dodatek wzorców. Powszechnie wiadomo, iż technika chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną UV nie zapewnia dobrej selektywności i czułości, by mogła być w każdym przypadku stosowana do monitorowania stężenia leków i ich metabolitów w próbkach biologicznych. Jednakże metody ekstrakcji analitów, opracowane w ramach prowadzonych przez mnie badań, umożliwiły odpowiednie oczyszczenie ekstraktów płynów ustrojowych, przez usunięcie substancji balastowych. W pracach H2, H5, H6, H11 wykazałam, że detekcja spektrofotometryczna UV może być z powodzeniem wykorzystana do badania zawartości wybranych leków i ich metabolitów w moczu pacjenta po wcześniejszym przygotowaniu próbki [36,39,40,45]. Opracowane procedury analityczne z zastosowaniem detekcji spektrofotometrycznej mogą zostać wykorzystane do rutynowych badań obecności farmaceutyków i ich metabolitów w płynach biologicznych pobieranych od pacjentów [H2, H5, H6, H11]. Z całą pewnością w badaniach farmakokinetycznych to technika LC-MS/MS jest cennym narzędziem do oznaczania farmaceutyków w próbkach rzeczywistych. Niestety ma podstawową wadę – jest kosztowna i przez to znacznie mniej dostępna w laboratoriach. W obliczu tych ograniczeń doniesienia literaturowe o metodach UHPLC-UV do określania zawartości leków należących do różnych grup terapeutycznych i ich metabolitów są cenne, szczególnie w rutynowych badaniach bioanalitycznych.

W ostatnich latach w literaturze naukowej widoczny jest trend wykorzystania wysokosprawnej chromatografii cieczowej, szczególnie sprzężonej ze spektrometrią mas (układ LC-MS lub LC-MS/MS) [61]. Z tych powodów, tematem kolejnych prac zawartych w opisie osiągnięć naukowych był dobór optymalnych warunków pracy spektrometru mas do

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

oznaczania wybranych leków i metabolitów oraz potencjalnych markerów chorób kardiologicznych. W badaniach zastosowałam chromatografię cieczową sprzężoną z tandemowym spektrometrem mas typu potrójny kwadrupol w trybie monitorowania wybranych reakcji MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) lub SRM (*Selected Reaction Monitoring*) [H1, H3, H4, H7–H10]. W procesie doboru warunków pracy spektrometru mas, takich jak sposób jonizacji (APCI, ESI), tryb tworzenia jonów (dodatnie/ujemne), napięcie przyłożone do poszczególnych elementów optyki jonowej oraz ciśnienie gazów (m.in. osłonowego i wspomagającego rozpylanie) zastosowałam różne sposoby wprowadzania roztworów wzorcowych farmaceutyków do układu: dozowanie z wykorzystaniem pompy strzykawkowej oraz dozowanie do strumienia fazy ruchomej – FIA (*flow injection analysis*). Niezależnie od warunków chromatograficznych obserwowałam znacznie niższą intensywność (wysokość i pole powierzchni pików), gdy stosowałam jonizację APCI, w porównaniu do jonizacji ESI. Dlatego w pracach H1, H3, H4, H7–H10 zastosowałam jonizację na drodze elektrorozpraszania w trybie rejestracji jonów dodatnich lub ujemnych, w zależności od obserwowanej intensywności jonów fragmentacyjnych oznaczanych związków. Jony o największej intensywności wykorzystywałam do tworzenia przejść jon macierzysty → jon fragmentacyjny w trybie MRM lub SRM [35,37,38,41–44]. Warto dodać, iż dla każdego analitu zaproponowałam dwa takie przejścia, co znacznie zwiększyło wiarygodność analiz jakościowych i zapewniło jednoznaczną identyfikację analitów. W sumie dobrałam warunki detekcji ESI-MS/MS dla ok. 50 związków [H1, H3, H4, H7–H10]. Warto przy tym zaznaczyć, że parametry te są charakterystyczne dla analitów i mogą zostać wykorzystane przez innych naukowców do oznaczania dowolnych analitów z grupy tych, które były przedmiotem moich badań.

W kolejnym etapie badałam reakcje fragmentacji wybranych jonów, dobierając parametry detektora charakterystyczne dla każdego związku w następujących zakresach: potencjał rozgrupowania klastrow (DP) od ± 1 V do ± 400 V, energia zderzeń (CE) od ± 5 V do 130 V oraz potencjał wyjścia jonów z komory zderzeń (CXP) od 0 V do ± 55 V. Dla wybranych analitów rejestrowałam również widma fragmentacyjne przy różnych wartościach CE. We wszystkich przypadkach przyłożenie niskiej wartości energii kolizji prowadziło do powstania głównie jonów fragmentacyjnych o wyższych masach cząsteczkowych. Zwiększenie wartości CE skutkowało wzrostem intensywności sygnałów jonów fragmentacyjnych o niższych masach cząsteczkowych, a fragmenty o masach wyższych nie były obserwowane na widmach. Dla każdej pary MRM lub SRM wybrałam taką wartość CE, dla której uzyskałam największą czułość metody [H1, H3, H4, H7–H10] [35,37,38,41–44]. Istotnym etapem prowadzonych i opisanych w wyżej wymienionych pracach badań nad doбором warunków detekcji MS/MS było określenie optymalnych parametrów źródła jonów: ciśnienia gazu osłonowego – CUR, wspomagającego rozpylanie – GS1 i pomocniczego – GS2, temperatury źródła (TEM), napięcia przyłożonego do igły – IS. W tym celu zastosowałam technikę FIA oraz dobrane warunki rozdzielania chromatograficznego (rodzaj rozpuszczalnika oraz natężenie przepływu fazy ruchomej). Podczas opracowywania parametrów detekcji badałam również wpływ czasu monitorowania charakterystycznych przejść m/z dla każdej pary MRM/SRM (*dwell time*) na intensywność sygnału analitów oraz na stosunek sygnału do szumu (S/N). Wpływ wartości *dwell time* na wielkość sygnału analitów był zróżnicowany. W pracy H9 monitorowanie przez 50 ms skutkowało dobrą intensywnością sygnału, jednakże przyjęcie 200 ms prowadziło do obniżenia wysokości pików dla większości analitów. Było to wywołane „utrą” punktów pomiarowych. Z kolei dla procedury opisanej w publikacji H7 wydłużenie *dwell time* do 100 ms, w publikacjach H1, H3 oraz H8 do 150 ms, a w publikacji H4 do 250 ms wpłynęło na zwiększenie S/N, a więc na poprawę czułości metod. Wybór

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

wartości *dwell time* stanowił więc kompromis między najwyższą intensywnością sygnału i wartością S/N a minimalną liczbą punktów pomiarowych przypadających na pik, która dla analizy ilościowej wynosi 12–15 punktów.

W pracach H1, H3, H4, H7–H10 wykazałam, że tandemowy spektrometr mas stanowi selektywny i czuły detektor, który w połączeniu z technikami chromatograficznymi pozwala na analizę ilościową i jakościową, badanych przeze mnie potencjalnych biomarkerów, leków oraz ich metabolitów. Aby przeprowadzić wiarygodną analizę z zastosowaniem detektora MS/MS, konieczne było przeprowadzenie kompleksowych badań i określenia wpływu wielu zmiennych na intensywność sygnału pochodzącego od oznaczanego analitu [35,37,38,41–44]. W pracach H1, H3, H4, H7–H10 wykazałam, że na jonizację cząsteczek analitu w źródle jonów wpływają jego właściwości (m.in. polarność, pK_a), a także czynniki związane z fazą ruchomą (m.in. lotność, napięcie powierzchniowe, polarność, pH) oraz ze spektrometrem mas (m.in. temperatura źródła jonów, ciśnienie gazu osłonowego i wspomagającego rozpylanie). Uwzględniając powyższe dane pojedynczo dla każdego związku przebadalam parametry charakterystyczne dla poszczególnych analitów, natomiast dla oznaczanych mieszanin związków dobrałam odpowiednie parametry źródła jonów. Praca w trybie MRM lub SRM umożliwiła uzyskanie bardzo dobrych wartości stosunku sygnału do szumu (S/N), a więc uzyskanie niskich granic wykrywalności i oznaczalności związków będących przedmiotem powyższych prac [35,37,38,41–44]. Zastosowane w badaniach warunki detekcji potencjalnych biomarkerów, leków i ich metabolitów nie zostały wcześniej przez innych autorów opisane w literaturze.

Opisane w publikacjach **H1** oraz **H9** procedury do oznaczania L-karnityny i jej pochodnych oraz kwasu α -ketoglutarynowego z zastosowaniem tandemowego spektrometru mas wykazują znaczną przewagę nad tymi opisanymi w literaturze, które zakładają użycie detektora fluorescencyjnego [35,43]. Detekcja spektrofotometryczna wymienionych związków możliwa była dopiero po przeprowadzeniu ich w pochodne zdolne do fluorescencji [54]. Konwersja chemiczna L-karnityny i jej pochodnych oraz kwasu α -ketoglutarynowego wymagała dodatkowych odczynników derywatyzyjących, była czasochłonna i wpływała na obarczenie wyników błędami. Stąd opracowane metody wykorzystujące detekcję MS/MS okazały się prostsze, a otrzymane wyniki były powtarzalne [**H1**, **H9**].

Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego

Dalsze badania ukierunkowane były na opracowanie oryginalnych metod rozdzielania potencjalnych biomarkerów oraz leków i ich metabolitów. W skład rozdzielanych mieszanin wchodziły substancje o różnej budowie cząsteczkowej (różne rodzaje i ilości podstawników w pierścieniach), o odmiennych właściwościach fizyko-chemicznych, różnej hydrofobowości, a tym samym o różnej retencji. Moje zainteresowania nad wykorzystaniem chromatografii ciekłowej skierowałam m.in. na szeroką grupę leków zróżnicowanych pod względem strukturalnym, ale również wykazujące odmienne działania farmakologiczne. Przedmiotem badań były następujące mieszaniny związków:

- praca **H1** – L-karnityna, acetylo-L-karnityna, kwas α -ketoglutarynowy – technika HPLC-MS/MS [35]
- praca **H2** – ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, aspiryna, naproksen, kwas salicylowy – technika UHPLC-UV [36]
- praca **H3** – riwaroksaban, aliskiren, prasugrel – technika UHPLC-MS/MS [37]
- praca **H4** – sotalolol, metoprolol, propranolol, karwedilol, nifedypina, kaptopryl, cilazapril, milrinon, tiklopidyna, furosemid, kwas acetylosalicylowy, kwas salicylowy,

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- ibuprofen, naproksen, ketoprofen, diklofenak, paracetamol, dipyron, mildronat, sildenafil, deksametazon, karbamazepina, terbinafina – technika UHPLC-MS/MS [38]
- praca **H5** – aliskiren, prasugrel, riwaroksaban, prednizolon, propranolol, ketoprofen, nifedypina, naproksen, terbinafina, ibuprofen, diklofenak, sildenafil, acenokumarol – technika UHPLC-UV [39]
 - praca **H6** – milrinon, enalapril, karwedilol, spironolakton, acenokumarol, tiklopidyna, cilazapril, 2-oksotiklopidyna, cilazaprilat, kanrenon, 5'-hydroksykarwedilol, O-desmetylokarwedilol, enalaprilat – technika UHPLC-UV [40]
 - praca **H7** – ibuprofen, 1-hydroksyibuprofen, 2-hydroksyibuprofen, 3-hydroksyibuprofen, karboksyibuprofen – technika UHPLC-MS/MS [41]
 - praca **H8** – aliskiren, enalapril, enalaprilat – technika UHPLC-MS/MS [42]
 - praca **H9** – L-karnityna, acetylokarnityna, propionylkarnityna, heksanylokarnityna, oktanylokarnityna, dekanylokarnityna, laurylokarnityna, myristonylokarnityna, palmitonylokarnityna – technika HILIC-UHPLC-MS/MS [43]
 - praca **H10** – metoprolol, karwedilol, propranolol, O-desmetylometoprolol, α -hydroksymetoprolol, 5'-hydroksykarwedilol, O-desmetylokarwedilol, 5-hydroksypropranolol – technika HILIC-UHPLC-UV [44]
 - praca **H11** – metoprolol, propranolol, tiklopidyna, karbamazepina, naproksen, acenokumarol, diklofenak, ibuprofen – technika UHPLC-UV [45].

Optymalne warunki rozdzielania chromatograficznego dobierałam w oparciu o podstawowe informacje na temat analitów (między innymi logP, pK_a, masę cząsteczkową). W pracach **H1–H11** badałam wpływ rodzaju wypełnienia i temperatury kolumny, składu, natężenia przepływu oraz pH fazy ruchomej oraz programu elucji gradientowej na rozdzielczość analitów. Podstawą doboru parametrów było uzyskanie jak najlepszego rozdzielania, czułości oraz zadowalającej powtarzalności, zachowując jednocześnie krótki czas analizy.

W ramach badań szczególną uwagę zwróciłam na aspekt doboru odpowiedniej fazy stacjonarnej do rozdzielania leków i ich metabolitów w odwróconym układzie faz [**H2–H8, H10**]. W tym celu przebadalam kolumny dedykowane do ultra-sprawnej chromatografii cieczowej o zróżnicowanych parametrach (polarność, długość, średnica, wielkość ziaren), w tym: Zorbax RRHD SB-C18 (50 mm×2,1 mm, 1,8 μ m), Hypersil GOLD™ (100 mm×2,1 mm, 1,9 μ m), Chromolith® Fast Gradient C18e monolityczna (50 mm×2 mm), Poroshell 120 EC-C18 (100 mm×2,1 mm, 2,7 μ m) oraz Poroshell 120 EC-C18 (100 mm×3,0 mm; 2,7 μ m), Fortis Diphenyl (50 mm×2,1 mm, 1,7 μ m) [36–42, 44]. Mało zadowalające wyniki (niską liczbę pól teoretycznych, brak symetrii pików oraz słabą rozdzielczość) uzyskałam stosując kolumny Hypersil GOLD™ oraz Chromolith® Fast Gradient C18e. Niską sprawnością charakteryzowała się także kolumna Fortis Diphenyl. Pasma chromatograficzne analitów zarejestrowane podczas użycia wyżej wymienionych kolumn były szerokie i asymetryczne, obserwowałam również ich nakładanie się. Ostatecznie rozdzielanie chromatograficzne leków i ich metabolitów przeprowadziłam z zastosowaniem sorbentu o małych cząstkach (sub-2 μ m) (Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 (50 mm×2,1 mm, 1,8 μ m) [**H3, H4, H7**] oraz kolumny typu *core-shell* Poroshell 120 EC-C18 (100 mm×3,0 mm; 2,7 μ m) [**H2, H5, H6, H10**] i (100 mm×2,1 mm; 2,7 μ m) [**H8**]. Wcześniej, w literaturze nie opisano zastosowania wybranych przeze mnie kolumn do rozdzielania związków będących przedmiotem niniejszych badań. W pracach **H2, H5, H6, H8, H10** udowodniłam wyjątkowo dobre właściwości kolumny otrzymanej w technologii opartej na sorbencie *core-shell* w zastosowaniu do oznaczania leków w próbkach biologicznych

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

[36,39,40,42,44]. Wypełnienie tej kolumny stanowi stały nieporowaty rdzeń silikonowy o średnicy 1,7 μm , na którym osadzona jest porowata warstwa krzemionki o grubości 0,5 μm , gdzie całkowita wielkość cząstek to 2,7 μm . Cząstki wypełnienia *core-shell* mają nominalną powierzchnię właściwą 120 m^2/g , a kontrolowana wielkość porów to 120 \AA .

W celu otrzymania wypełnienia EC-C18, wypełnienie typu Poroshell jest chemicznie wiązane z gęstą monowarstwą dimetylo-*n*-oktadecylosilanu. Tak związana faza jest poddawana procesowi „*endcapped*” za pomocą odpowiedniego odczynnika, w celu maksymalnej dezaktywacji powierzchni krzemionki. Dzięki takiej budowie wypełnienia kolumny uzyskałam wysokie sprawności (liczba pól teoretycznych w zakresie od 65281 do 550016 – praca **H2**, od 15222 do 196551 – praca **H5**, od 24300 do 167018 – praca **H6**) charakterystyczne przy stosowaniu całkowicie porowatych cząstek wypełnienia o mniejszych średnicach oraz osiągnęłam mniejsze ciśnienie zwrotne. Dodatkowym atutem było uzyskanie bardzo dobrych rozdzielczości pików ($R_s > 1,5$), podobnie jak podczas użycia kolumn o średnicy uziarnienia 1,7 μm , przy ciśnieniu poniżej 400 bar. Dzięki temu możliwe było wykonywanie analiz w krótszym czasie, ograniczając przy tym zużycie drogich i szkodliwych rozpuszczalników organicznych. Wszystkie korzyści jakie uzyskałam po zastosowaniu kolumny Poroshell wynikają z ograniczenia między innymi dyfuzji wirowej, oporu przenoszenia masy oraz zminimalizowania rozkładu cząstek w kolumnie. *Pozwoliło to na osiągnięcie ultra wysokich sprawności. Zwiększona sprawność wpłynęła z kolei na lepszą czułość metody, ponieważ na chromatogramach powstawały wąskie, symetryczne i dobrze rozdzielone piki* [36,39,40,42,44].

W ramach badań określiłam również wpływ składników fazy ruchomej na parametry chromatograficzne. Jako modyfikatory organiczne stosowałam zarówno acetonitryl [**H2**, **H3**, **H5–H8**, **H10**], jak i metanol [**H4**], a główny składnik fazy ruchomej stanowił wodny roztwór kwasu mrówkowego [**H3**, **H4**, **H7**, **H8**, **H10**] lub trifluoroctowego (TFA) [**H2**, **H5**, **H6**, **H10**]. Zastosowanie kwasu TFA oraz kwasu mrówkowego wpłynęło najkorzystniej na selektywność rozdzielania wybranych związków. Ponadto w wyniku zastosowania w fazie ruchomej dodatku tego modyfikatora kwasowego, uzyskałam dobry kształt pików (współczynnik asymetrii f_{AS} w zakresie od 1,00 do 1,31). Nieco gorsze wyniki uzyskałam po zastosowaniu kwasu mrówkowego. W badaniach sprawdziłam także wpływ dodatku kwasu octowego do wodnego składnika fazy ruchomej. Po dodaniu kwasu octowego zaobserwowałam znaczne pogorszenie rozdzielczości oraz symetrii pików w porównaniu zarówno do wyników uzyskanych z użyciem kwasu mrówkowego, jak i TFA. Otrzymane wyniki uzasadniają wybór kwasu TFA, jako dodatkowego składnika eluentu wpływającego na poprawę rozdzielania wybranych leków i ich metabolitów [37,38,41,42,44]. Zastosowanie w celu detekcji spektrometru mas, warunkowało konieczność zastąpienia kwasu TFA, dodawanego do wodnego składnika fazy ruchomej, kwasem mrówkowym [36,39,40,44]. Obecność kwasu TFA w fazie ruchomej powoduje tłumienie sygnału i zapobiega skutecznemu tworzeniu aerozolu ze względu na duże napięcie powierzchniowe fazy ruchomej.

Na podstawie wykonanych badań obserwowałam również wpływ pH fazy ruchomej na retencję analitów. Wzrost selektywności rozdzielania, poprawa symetrii pików, a także zwiększenie czułości metody następowały wraz z obniżeniem wartości pH wodnego składnika fazy ruchomej. Wzrost pH fazy ruchomej od wartości 2,5 do 6,5 powodował znaczne pogorszenie rozdzielania analitów, zwiększenie szerokości pików, a także spadek liczby pól teoretycznych. W wyniku analiz z zastosowaniem wody bez dodatku kwasu, jako składnika fazy ruchomej, otrzymałam chromatogramy, na których znajdowały się piki o bardzo krótkim czasie retencji. Optymalne warunki pod względem retencji analitów oraz ich rozdzielania uzyskałam z zastosowaniem 0,05% wodnego roztworu kwasu TFA [**H2**, **H5**, **H6**,

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

H10] lub 0,1% wodnego roztworu kwasu mrówkowego [**H3, H4, H7, H8, H10**], których pH wynosiło odpowiednio pH=2,5 i pH=3,5. Dodatek do fazy ruchomej kwasu wpłynął korzystnie na symetrię pików oznaczanych substancji oraz ograniczył efekt ogonowania pików chromatograficznych [36–42,44].

W celu uzyskania odpowiedniego rozdzielenia leków i ich metabolitów przebadalam możliwość prowadzenia zarówno elucji izokratycznej, jak i gradientowej. Zastosowanie elucji izokratycznej było możliwe tylko w przypadku rozdzielania trzech leków nowej generacji stosowanych w kardiologii, tj. riwaroksabanu, prasugralu oraz aliskirenu [**H3**]. Dodatkową zaletą metody opisanej w publikacji **H3** jest bardzo krótki czas analizy, który wynosi zaledwie 1,5 minuty [37]. *Z uwagi na fakt, że oznaczane leki zostały wprowadzone na rynek po 2009 roku, istnieje bardzo mało danych literaturowych na temat ich chromatograficznego oznaczania. Dlatego prace analityczne prowadzone przeze mnie można traktować jako wiodące w tej tematyce.*

W celu uzyskania dobrego rozdzielania mieszanin różnych analitów konieczne było zastosowanie elucji gradientowej [**H2, H4–H8, H10**]. Modyfikowałam początkowy skład fazy ruchomej zmniejszając i zwiększając stężenie składnika organicznego: metanolu lub acetonitrylu. W początkowej fazie elucji gradientowej, gdy moc fazy ruchomej była słaba, dostatecznie dużą szybkość migracji osiągnęły substancje o niskiej wartości logP, a więc o słabej retencji w odwróconym układzie faz. Wzrost stężenia rozpuszczalnika organicznego w początkowym składzie eluentu powodował wzrost siły elucji fazy ruchomej i zmniejszenie czasu retencji wszystkich analitów. Badalam również efekt szybkości przyrostu stężenia składnika organicznego w fazie organicznej [36,38–42,44]. Odpowiednie skrócenie czasu przyrostu stężenia składnika w fazie ruchomej skutkowało skróceniem czasów retencji analitów najbardziej hydrofobowych, poprawą kształtu pików, a przy tym nie wpłynęło na obniżenie sprawności układu i pogorszenie rozdzielania analitów [**H8**]. W przypadku mieszaniny leków oznaczanych w pracach **H4–H6** konieczne było obniżenie szybkości przyrostu ilości składnika organicznego w fazie ruchomej, co poprawiło separację trudnych do rozdzielania analitów, a przy tym tylko nieznacznie wydłużyło całkowity czas analizy do 5 minut.

W ramach prowadzonych badań określiłam także wpływ temperatury kolumny na parametry chromatograficzne. Analizę prowadziłam w temperaturze 25°C [**H2, H5, H6, H8, H10**], 35°C [**H4, H7**] oraz 45°C [**H3**]. Na podstawie otrzymanych wyników opisanych w pracach **H3, H4, H7** można wnioskować, iż czasy retencji badanych związków malały wraz ze wzrostem temperatury kolumny Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 do 35°C lub 45°C. Może to być spowodowane zmniejszeniem lepkości rozpuszczalnika, a także przyspieszeniem dyfuzji cząsteczek. Pomimo iż wzrost temperatury kolumny wpływał na skrócenie czasów retencji leków i metabolitów, nie wpłynęło to na pogorszenie ich rozdzielczości [37,38,41]. Zastosowanie wyższych temperatur kolumny spowodowało zmniejszenie szerokości pików, wzrost ich wysokości, a także większą liczbę pól teoretycznych. Otrzymane wyniki dla wszystkich analitów wskazują na liniowy wzrost ich współczynników retencji ($\ln k = f(1/T)$) ($R^2 > 0.9897$), co świadczy o stałym mechanizmie retencji w zakresie badanych temperatur. Wynika on z ustalenia procesu równowagi podziału oznaczanych związków pomiędzy fazą stacjonarną a fazą ruchomą.

Innym podejściem metodycznym do oznaczania leków z grupy β -blokerów i ich metabolitów było zastosowanie chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC) [**H11**]. Przedmiotem pracy **H11** były badania podstawowe nad mechanizmem retencji analitów na różnych kolumnach HILIC (ZORBAX RRHD Plus Poroshell 120 HILIC (100 mm×3,0 mm; 1,7 μ m), ZORBAX RRHD HILIC Plus (100 mm×3,0 mm; 1,8 μ m), ACQUITY UPLC BEH

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

HILIC (75 mm×2,1 mm; 1,7 μm), Acclaim HILIC-10 (150 mm×4,6 mm; 3,0 μm), Luna HILIC (150 mm×4,6 mm; 3,0 μm)) oraz w różnych warunkach analizy (badalam wpływ zawartości acetonitrylu, natężenia przepływu fazy ruchomej, temperatury kolumny, stężenia roztworów octanu i mrówczanu amonu, objętości dozowanej próbki, pH fazy ruchomej, rodzaju rozpuszczalnika organicznego) [45]. Otrzymane wyniki pozwoliły na sformułowanie wniosków dotyczących retencji wybranych leków i ich metabolitów w układzie HILIC. Zaobserwowałam, że retencja analitów wzrasta wraz ze wzrostem zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Dla wszystkich badanych faz stacjonarnych mechanizm retencji oparty był głównie na podziale analitów pomiędzy fazę stacjonarną a ruchomą, jednak w przypadku fazy ZORBAX pojawiały się także oddziaływania elektrostatyczne z analitami, a dla faz modyfikowanych istotną rolę odgrywało tworzenie wiązań wodorowych. Wzrost stężenia soli w fazie ruchomej wpływał na spadek retencji analitów z uwagi na osłabienie oddziaływań elektrostatycznych z fazą stacjonarną. Z kolei zastąpienie octanu amonu mrówczanem powodowało zmniejszenie czasów retencji ze względu na silniejszą jonizację soli i konkurencję jonów amonowych z analitami o powierzchnię fazy stacjonarnej. Zaobserwowałam również, że wraz ze wzrostem pH fazy ruchomej wydłuża się czas retencji ze względu na wzrost hydrofilowości analitów. Dla karwedilolu i jego metabolitów obserwuje się natomiast skrócenie czasu retencji wraz ze wzrostem pH, co jest związane ze słabymi właściwościami zasadowymi analitów. Podwyższenie temperatury powodowało wzrost retencji analitów w kolumnie chromatograficznej, ze względu na szybszą wymianę masy, osłabienie oddziaływań elektrostatycznych i tworzenie wiązań wodorowych. Z otrzymanych danych jednoznacznie wynika również, że zastąpienie acetonitrylu alkoholem skraca czas retencji ze względu na utrudnienie tworzenia się warstwy wody na powierzchni fazy stacjonarnej [45].

Opracowane i opisane w pracach [H2–H8, H10, H11] metody chromatograficzne charakteryzują się zadowalającą powtarzalnością czasów retencji. Mierzone wartości współczynników zmienności CV dla czasów retencji analitów nie przekraczają 5,0%. *Niewątpliwie zasadniczymi zaletami opracowanych metodyk z zastosowaniem techniki UHPLC w stosunku do tradycyjnego HPLC było nie tylko skrócenie czasu analizy (co jest oczywiste), ale także podniesienie czułości oraz rozdzielczości. Należy zauważyć, że skracając czas analizy zasadniczo zmniejszone zostały koszty analiz oraz zużycie odczynników. Dodatkowy wpływ na to miało skrócenie czasu stabilizacji układu, gdyż objętość martwa uległa znacznemu zmniejszeniu. Poza tym należy podkreślić, że nowe metody charakteryzują się dobrą rozdzielczością i sprawnością, dzięki czemu składniki matrycy zostały lepiej rozdzielone i nie interferowały z analitami będącymi przedmiotem badań [36–42,44,45]. Ponadto po raz pierwszy przebadany zastał mechanizm retencji β-blokerów i ich metabolitów w układzie HILIC z zastosowaniem pięciu różnych faz stacjonarnych i różnych warunków rozdzielania chromatograficznego [45].*

Większość opisanych dotychczas w literaturze procedur pozwala na oznaczanie pojedynczych leków albo rzadziej leków i ich metabolitów [62–65]. Tylko nieliczne doniesienia zawierają informacje na temat doboru warunków chromatograficznych do rozdzielania farmaceutyków z różnych grup terapeutycznych i ich metabolitów [66–70]. W skład rozdzielanych mieszanin wchodziły inne anality, niż te, które były przedmiotem podjętych przeze mnie badań. Co więcej, do oznaczania wybranych przeze mnie związków najczęściej stosowana była tradycyjna wysokosprawna chromatografia cieczowa, a całkowite czasy analizy mieściły się w zakresie od 2,1 do 22 minut [62–70]. Należy także podkreślić, że wprowadzone do terapii leki nowej generacji stosowane w kardiologii, nie były wcześniej oznaczane w próbkach moczu. Stąd istniała potrzeba opracowania i wdrożenia nowych metod analitycznych do monitorowania ich stężenia w płynach biologicznych. Opisane

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

w pracach [H2–H8, H10, H11] mieszaniny związków nigdy wcześniej nie były równocześnie oznaczane [36–42,44,45].

W kolejnych dwóch publikacjach [H1] i [H9] opisałam wyniki badań, w których podjęłam próbę rozdzielania wybranych związków endogennych (L-karnityny i jej pochodnych oraz kwasu α -ketoglutazarowego) z zastosowaniem HPLC-MS/MS [35,43]. W pracy H1 przedstawiłam problematykę rozdzielania L-karnityny, acetylo-L-karnityny oraz kwasu α -ketoglutazarowego w odwróconym układzie faz z zastosowaniem oktanowego oraz oktadecylowego wypełnienia kolumn chromatograficznych. Oddziaływania analitów z długimi łańcuchami alkilowymi fazy stacjonarnej C18 były tak słabe, że anality eluowały w martwym czasie analizy. Oznaczane związki wykazywały retencję jedynie w kolumnie ze złożem oktanowym, które charakteryzuje się średnią hydrofobowością o silniejszej aktywności wolnych grup silanolowych na powierzchni żelu krzemionkowego w porównaniu z wypełnieniem C18. Dobre rozdzielanie L-karnityny, acetylo-L-karnityny oraz kwasu α -ketoglutazarowego uzyskałam stosując mniej hydrofobowe wypełnienie kolumny C8 oraz mieszaninę 0,1% kwasu mrówkowego w wodzie i acetonitrylu w programie elucji izokratycznej [35]. *Uzyskałam całkowite rozdzielanie potencjalnych biomarkerów w czasie 3 minut. Największym osiągnięciem jest jednak nie tylko redukcja czasu niezbędnego do uzyskania rozdzielania, ale modyfikacja składu fazy ruchomej.* Inne metody rozdzielcze stosowane w analizie tych związków wykorzystują bufony o różnych stężeniach lub trietyloaminę, co jest często przyczyną ograniczonych możliwości zastosowania w połączeniu ze spektrometrią mas [54,71,72]. Z tego względu opracowane i opisane w pracy H1 nowe podejście oparte na wykorzystywaniu w fazie ruchomej tylko wodnego roztworu kwasu mrówkowego oraz acetonitrylu, przy zachowaniu symetrycznych kształtów pików, może być konkurencyjne w stosunku do dotychczas stosowanych procedur analitycznych.

Jak wspomniano, istotnym problemem prowadzonych badań opisanych w pracy H1 było uzyskanie retencji L-karnityny i jej acylowej pochodnej w odwróconym układzie faz. Wyniki badań opisane w pracy H1 skłoniły mnie do dalszej pracy nad udoskonaleniem metody oznaczania potencjalnych biomarkerów z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Zakres badawczy nad doбором warunków rozdzielania chromatograficznego poszerzyłam o siedem nowych, estrowych pochodnych L-karnityny [H9]. Znacząca różnica w polarności L-karnityny i jej estrowych pochodnych implikuje dodatkowe trudności w opracowaniu metody ich równoczesnego oznaczania. W związku z powyższym przeprowadziłam badania nad wpływem różnych czynników na selektywność opracowanej procedury z zastosowaniem kolumny Acquity UPLC BEH HILIC (75 mm × 2,1 mm, 1,7 μ m) [43].

Badalam wpływ różnych rozpuszczalników organicznych: acetonitrylu, metanolu, etanolu oraz izopropanolu, jako składników fazy ruchomej. Zauważyłam że retencja analitów wzrasta wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego w strukturze stosowanych alkoholi. W tym samym kierunku spada ich moc elucji w układzie HILIC. Spadek polarności rozpuszczalnika prowadzi do zwiększenia przejścia analitów do warstwy wody osadzonej na powierzchni fazy stacjonarnej, a tym samym do ich lepszej retencji. Najdłuższy czas analizy zaobserwowałam po zastosowaniu izopropanolu, zaś najkrótszy po użyciu metanolu. Metanol wykazuje największą zdolność do tworzenia wiązań wodorowych i w związku z tym najsilniej przeszkadza w tworzeniu warstwy wody na powierzchni fazy stacjonarnej. W skrajnych przypadkach mogło dojść do zastąpienia wody w utworzonej warstwie przez metanol. W ten sposób faza stacjonarna uzyskała bardziej hydrofobowy charakter, co wpływało na słabsze oddziaływania faza stacjonarna–analit. Tworzenie wiązań wodorowych

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

z analitami powodowało także osłabienie oddziaływań elektrostatycznych z fazą stacjonarną. Etanol i izopropanol mają mniejszą zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, a więc słabiej konkurują z analitami o miejsca aktywne fazy stacjonarnej. Dlatego też dla tych alkoholi zaobserwowałam zdecydowanie dłuższe czasy retencji niż w przypadku metanolu. Ponadto w wyniku tworzenia wiązań wodorowych pomiędzy alkoholami a analitami występowały dodatkowe struktury rezonansowe, co prowadziło do poszerzenia pików chromatograficznych. Zastąpienie alkoholi acetonitrylem, rozpuszczalnikiem o mniejszej mocy elucji, wpłynęło na wydłużenie czasów retencji. Acetonitryl nie bierze udziału w tworzeniu wiązań wodorowych, dlatego nie przeszkadzał w tworzeniu warstwy wody i nie zakłócał procesu podziału. Zastosowanie fazy ruchomej zawierającej alkohole powodowało znaczne wydłużenie czasu stabilizacji złoża kolumny, a w trakcie analizy dochodziło do zaburzeń linii bazowej. Jako organiczny składnik fazy ruchomej wybrałam zatem acetonitryl [H9].

Czynnikiem silnie wpływającym na efektywność rozdzielania analitów była zawartość acetonitrylu w fazie ruchomej. Dla wszystkich oznaczanych związków obserwowałam wzrost retencji wraz ze wzrostem zawartości acetonitrylu w fazie ruchomej. Działo się tak na skutek przesunięcia równowagi podziału hydrofilowych analitów w kierunku warstwy wody osadzonej na powierzchni fazy stacjonarnej. Kiedy zawartość rozpuszczalnika organicznego w fazie ruchomej była duża, a zatem grubość zaadsorbowanej warstwy wody niewielka, pojawiły się także bezpośrednie oddziaływania pomiędzy analitami a powierzchnią sorbentu, co wpłynęło na lepsze rozdzielanie związków. Zmiana zawartości rozpuszczalnika organicznego najsilniej wpłynęła na retencję najbardziej hydrofilowych analitów (L-karnityny i acetylo-L-karnityny). Najefektywniejsze rozdzielanie analitów uzyskałam przy zastosowaniu zmiennej zawartości acetonitrylu, tj. przyrost zawartości acetonitrylu następował od 25% do 50% w czasie 2,5 minuty [43].

Kolejnym etapem było zbadanie wpływu dwóch soli amonowych na retencję analitów. Do tego celu wykorzystałam roztwory mrówczanu amonu ($\text{pH}=6,2$) i octanu amonu ($\text{pH}=6,6$). Zaobserwowałam spadek retencji przy zastąpieniu octanu amonu mrówczanem amonu. Roztwory tych soli wykazują podobną siłę elucji, lecz różnic należy dopatrywać się w wartościach pK_a . W przypadku roztworu mrówczanu amonu pK_a wynosi 3,75, natomiast dla octanu amonu $\text{pK}_a=4,75$. W powyższych warunkach mrówczan jest silniej zjonizowany niż octan, co zwiększa stężenie jonów amonowych w pobliżu powierzchni fazy stacjonarnej. Jony te konkurują z jonami badanych związków i adsorbują się na powierzchni fazy stacjonarnej. Skrócenie czasu retencji analitów po zastosowaniu mrówczanu amonu wpłynęło na utratę rozdzielczości pików, dlatego do dalszych badań wybrałam octan amonu.

Wpływ stężenia octanu amonu na retencję analitów badałam w zakresie stężeń od 2 mM do 10 mM. W publikacji H9 wykazałam, że wzrost stężenia soli powodował wzrost siły elucji fazy ruchomej, skutkując skróceniem czasów retencji analitów. W przypadku zastosowanej w badaniach kolumny zawierającej niemodyfikowany żel krzemionkowy, obniżenie stężenia soli osłabiło elektrostatyczne przyciąganie pomiędzy bardziej kwasowymi analitami a deprotonowanymi grupami silanolowymi, skracając tym samym czas retencji. Efektywne rozdzielanie uzyskałam z zastosowaniem 5 mM octanu amonu o pH równym 6,4 [43].

Kolejno określiłam wpływ temperatury kolumny na retencję analitów. Zaobserwowałam nieznaczny spadek retencji wraz ze wzrostem temperatury dla oznaczanych związków z wyjątkiem myristonylokarnityny oraz palmitonylokarnityny. Przyczyną skrócenia retencji analitów w kolumnie może być fakt, że wraz ze wzrostem temperatury rośnie intensywność ruchów termicznych. To z kolei mogło prowadzić do osłabienia wiązań wodorowych

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

tworzących się pomiędzy fazą stacjonarną a analitami. Wzrost retencji myristonylokarnityny oraz palmitonylokarnityny (słabo rozpuszczalnych w wodzie) w wyższych temperaturach jest związany prawdopodobnie ze wzrostem rozpuszczalności w warstwie wody. Ostatecznie temperatura kolumny zastosowanej w badaniach wynosiła 30°C.

W warunkach opisanych w publikacji **H9** uzyskałam najlepsze rozdzielanie badanych związków. Anality eluowały w czasie krótszym niż 2,5 minuty, a otrzymane na chromatogramie piki były symetryczne [43]. Dla wszystkich związków współczynnik asymetryczności nie przekraczał 1,05, a uzyskana liczba pól była wysoka. *Poprawność uzyskanych wyników wskazuje na dużą potencjalną przydatność metody HILIC do rozdzielania L-karnityny i jej estrowych pochodnych, a użycie spektrometru mas może oczywiście rozszerzyć zakres zastosowania opracowanej procedury. Warto podkreślić, że opracowana metoda HILIC-MS/MS została po raz pierwszy zastosowana do oznaczania L-karnityny i jej pochodnych w próbkach moczu. Analiza w dobranych warunkach HILIC zapewnia bardzo dobrą separację oznaczanych związków i z powodzeniem może być wykorzystywana do monitorowania ich obecności w próbkach rzeczywistych.*

Sprawdzenie poprawności metod analitycznych i ich zastosowanie do oznaczania wybranych analitów w próbkach rzeczywistych

Wyznaczenie parametrów walidacji opracowanych procedur

Każdą opracowaną procedurę analityczną poddałam procesowi walidacji, którego celem było określenie zakresu jej przydatności oraz ocena jej wiarygodności. W ramach prac **H1–H11** określiłam selektywność metody, wyznaczyłam zakres liniowości; granicę oznaczalności; granicę wykrywalności; precyzję; dokładność; odzysk oraz stabilność, a w ramach prac **H1, H3, H4, H7–H9, H10** dodatkowo efekt matrycowy.

Zastosowane w badaniach wstępne oczyszczenie próbek moczu oraz osocza z wykorzystaniem opracowanych procedur SALLE [45], USAEME [41], SPE [35,39] oraz MEPS [36,37,40,42,43] pozwoliło na wystarczające usunięcie składników matrycy. Na chromatogramach widoczne są niezidentyfikowane piki pochodzące od endo- i egzogennych składników płynów biologicznych, jednakże mają one inne czasy retencji, a tym samym nie utrudniają oznaczenia analitów i nie powodują zafałszowania wyników. W związku z powyższym opracowane w ramach badań procedury analityczne z zastosowaniem technik UHPLC-UV, HPLC-MS/MS oraz UHPLC-MS/MS mogą zostać zastosowane do badania próbek pochodzących od osób przyjmujących wybrane leki oraz do oznaczania kwasu α -ketoglutarynowego, L-karnityny i jej pochodnych.

Linowość opracowanych metod wyznaczyłam w oparciu o krzywe kalibracyjne z zastosowaniem wzorca wewnętrznego, w zakresach stężeń odpowiadających zawartości analitów w próbkach rzeczywistych. Zakresy liniowości oznaczanych związków wraz ze współczynnikami determinacji (R^2) zostały przedstawione w pracach **H1–H11**. *Wysokie wartości liczbowe współczynników determinacji wskazują na liniowość krzywych kalibracyjnych w badanych zakresach stężeń [35–45].*

Granice wykrywalności i granice oznaczalności wyznaczyłam w określonym zakresie liniowości metody dla każdego badanego związku. Analizując otrzymane wyniki zaobserwowałam różnice w niektórych wartościach LOD oraz LOQ otrzymanych dla tych samych związków z zastosowaniem tego samego detektora. Wynikają one z zastosowania innej kolumny chromatograficznej, a także innych parametrów chromatograficznych (program

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

elucji gradientowej, temperatura kolumny). Dodatkowo zaobserwowane różnice potwierdzają, iż pojęcie granicy wykrywalności związane jest ściśle z określoną procedurą analityczną, a wartość liczbową LOQ oraz LOD zależy nie tylko od poziomu zawartości oznaczanego składnika, ale również od obecności innych składników występujących w badanej próbce. Przedstawione w pracach **H5, H6, H10, H11** wartości LOD oraz LOQ są podobne do wyników otrzymanych przez innych autorów, którzy również stosowali połączenie chromatografii cieczowej z detektorem spektrofotometrycznym. Dane zamieszczone w literaturze podają wartości LOQ rzędu 0,04 – 3,75 µg/mL [51,63,68,70]. Zastosowanie spektrometru mas [**H1, H3, H4, H7–H10**] na etapie oznaczeń końcowych pozwoliło na znaczne obniżenie granicy oznaczalności analitów w stosunku do opisanych wcześniej metod. Dodatkowo zwiększenie czułości metody osiągnęłam dzięki jonizacji analitów przez elektrorozpraszanie [35,37,38,41–44]. Zarówno w przypadku leków i ich metabolitów, jak i karnityny i jej pochodnych otrzymałam granice wykrywalności na poziomie femtomoli dla próbek o objętościach od 2 do 5 µL dozowanych do kolumny chromatograficznej. *Na podstawie otrzymanych danych można stwierdzić, że opracowane procedury umożliwiają oznaczenie leków i ich metabolitów oraz potencjalnych biomarkerów chorób kardiologicznych na niskich poziomach stężeń.* Przedstawione wyniki potwierdzają, że czułość tych metod znacznie przekracza możliwości metod opracowanych z zastosowaniem detektora UV.

W celu oszacowania powtarzalności metod wyznaczyłam współczynniki zmienności (CV) dla trzech serii próbek o różnych stężeniach (LQC – niski, MQC – średni, HQC – wysoki) z zakresów liniowości metod. Wyznaczyłam także precyzję pośrednią, co pozwoliło mi określić długoterminowe odchylenie procesu pomiarowego. Wielkość precyzji pośredniej wyraziłam jako całkowity współczynnik zmienności dla wszystkich wyników uzyskanych na podstawie analiz prowadzonych przez pięć kolejnych dni. Ponadto wyznaczyłam dokładność, wyrażoną jako błąd względny (RE, *relative error*). Dokładność określiłam zarówno dla wyników otrzymanych na podstawie analiz wykonanych w ciągu jednego dnia, jak i w ciągu kolejnych dni. Uzyskane w toku procedury walidacyjnej wyniki dla mieszanin różnych związków zamieściłam w pracach **H1–H11**. Przeprowadzone eksperymenty charakteryzowały się dobrą powtarzalnością i precyzją pośrednią. Na zadowalającym poziomie znajdują się również wartości błędu względnego. Na podstawie analizy wyników przeprowadzonych badań stwierdziłam także, że stopień zgodności wyników, otrzymanych na drodze niezależnych badań tych samych poziomów stężeń analitów w okresie pięciu dni był wysoki [35–45]. *Podsumowując, z pełnym przekonaniem można stwierdzić, iż opracowane metody UHPLC-UV, HPLC-MS/MS oraz UHPLC-MS/MS są odpowiednie do dokładnej i precyzyjnej analizy leków i ich metabolitów oraz kwasu α -ketoglutazarowego, L-karnityny i jej estrowych pochodnych w płynach biologicznych* [35–45].

Bardzo ważnym elementem udokumentowania wiarygodności metody analitycznej było badanie stopnia odzysku analitów. Wyniki przedstawione w pracach **H1–H11** oraz w pierwszej części niniejszego autoreferatu wskazują na ogromne znaczenie rodzaju sorbentu oraz rozpuszczalnika stosowanego do ekstrakcji analitów z próbek rzeczywistych. W tej części badań zastosowałam zoptymalizowane procedury przygotowania próbek, a na podstawie otrzymanych wyników wykazałam, 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 wybranych analitów z matrycy biologicznej, przy zastosowaniu opracowanych procedur przygotowania próbek. *Każda opracowana procedura analityczna pozwala uzyskać odzysk analitów na poziomie powyżej 70%* [35–45]. Tylko w nielicznych przypadkach uzyskałam odzysk nieco powyżej 100% [36,37,39,41,43–45].

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

Może to wskazywać na niewielką koelucję innych związków egzo- i endogennych (szczególnie polarnych) trudnych do usunięcia na etapie oczyszczania matrycy. Odzysk w optymalnych warunkach przygotowania próbek moczu dla każdego analitu, występującego w próbce na trzech poziomach stężeń, zestawiałam w pracach [H1–H11].

W procedurach analitycznych wykorzystujących sprzężenie chromatografii cieczowej ze spektrometrią mas [H1, H3, H4, H7–H10] do analizy próbek biologicznych charakteryzujących się złożonym składem matrycy, bardzo istotną częścią walidacji było wyznaczenie efektów matrycowych (ME, *matrix effect*). W badaniach opisanych w powyższych pracach efekt matrycowy powodował jedynie niewielkie osłabienie lub wzmocnienie sygnałów (ME w granicach od -14,5% do 12,7%) pochodzących od analitów [35,37,38,41–44]. W przypadku większości analitów zaobserwowałam osłabienie intensywności sygnału na skutek efektu matrycowego. Ponadto efekt matrycowy był zazwyczaj większy przy niższych stężeniach oznaczanych związków. *Na podstawie przeprowadzonych badań nie stwierdziłam wpływu matrycy na czułość opracowanych metod HPLC-MS/MS oraz UHPLC-MS/MS, która była wystarczająca do oznaczania potencjalnych biomarkerów chorób kardiologicznych oraz leków i ich metabolitów w płynach biologicznych.*

W ramach prowadzonych badań podjęłam także próbę określenia stabilności analitów w różnych warunkach przechowywania próbek przed i w trakcie analizy (test zamrażania–rozmarzania, ocena stabilności krótkoterminowej, długoterminowej, stabilności próbek po ekstrakcji (przechowywanych w automatycznym podajniku próbek) [H1–H9, H11]. Otrzymane wyniki badań stabilności wskazują, że stężenia oznaczanych związków nie uległy znaczącym zmianom w próbkach moczu oraz osocza przechowywanych w temperaturze pokojowej, w 5°C, w -20°C, w czasie 12 godzin, 24 godzin oraz 30 dni. Świadczą o tym niskie wartości błędu względnego, które dla wszystkich analitów znajdują się poniżej dopuszczalnej granicy stabilności [35–43,45]. *Stabilność leków i ich metabolitów oraz potencjalnych biomarkerów gwarantuje, że zmienność otrzymywanych wyników jest wynikiem zmienności metody, a nie brakiem stabilności analitów w czasie przechowywania próbek przed analizą.*

Zastosowanie opracowanych metod do terapeutycznego monitorowania leków oraz do poszukiwania potencjalnych biomarkerów chorób kardiologicznych

W celu terapeutycznego monitorowania leków opracowane, zoptymalizowane i zwalidowane procedury analityczne zastosowałam do wykrywania i oznaczania leków oraz ich metabolitów w płynach ustrojowych. Analizę z zastosowaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas prowadziłam w trybie monitorowania wybranych reakcji złożonych (MRM) [H3, H4, H7, H8, H10]. W celu analizy ilościowej oraz jakościowej analizowałam jony fragmentacyjne protonowanych [H3, H4, H8] lub deprotonowanych [H4, H7] jonów pseudomolekularnych każdej oznaczanej substancji. Identyfikację związków w próbkach rzeczywistych wykonywałam na podstawie trzech wybranych jonów dla każdego analitu – jeden jon macierzysty i dwa jony potomne. W celu analizy ilościowej dla każdego z badanych związków identyfikowałam 2 jony: jon macierzysty i jon fragmentacyjny [37,38,41,42,44]. W ramach badań prowadzonych z zastosowaniem detektora spektrofotometrycznego związku identyfikowałam w oparciu o porównanie czasów retencji z uzyskanymi danymi dla wzorców oraz metodą dodatku wzorca [H2, H5, H6, H10].

Przebadałam próbki pochodzące od osób zażywających niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen, paracetamol, naproksen) [H2, H4, H5, H7], β -blokery (karwedilol, metoprolol, propranolol) [H4, H5, H6, H10], nowy lek stosowany w terapii objawowej żylnej

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

choroby zatorowo-zakrzepowej (riwaroksaban) [H3], lek będący blokerem receptora aldosteronowego (spironolakton) [H6] oraz lek należący do grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (enalapril) [H6, H8]. Ponadto oznaczałam metabolity karwedilolu, tiklopidyny, enalaprilu, spironolaktonu, aspiryny oraz ibuprofenu. Próbkę moczu pobierane były od pacjentów w różnych odstępach czasu od podania leku, np. po 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h od podania pacjentom ibuprofenu [H2].

Opracowaną w pracy H7 procedurę USAEME-UHPLC-MS/MS po raz pierwszy zastosowałam do oznaczania ibuprofenu i jego czterech metabolitów. Ilości poszczególnych leków w odniesieniu do całkowitej dawki były następujące: ibuprofen 5,7%–6,8%, 1-hydroksyibuprofen 4,7%–5,8%, 2-hydroksyibuprofen 27,4%–28,2%, 3-hydroksyibuprofen 1,5%–2,2%, karboksyibuprofen 25,2%–26,8%, a całkowita wydalona ilość wynosiła 60,3%–64,5%. Dwa główne metabolity 2-hydroksyibuprofen i karboksyibuprofen oznaczyłam w ludzkim moczu w wyższych stężeniach, natomiast dwa metabolity 1-hydroksyibuprofen oraz 3-hydroksyibuprofen oznaczyłam w moczu pacjentów na bardzo niskim poziomie stężeń [41]. *W literaturze nie opisano dotychczas metody, która pozwalałaby na równoczesne oznaczanie tych związków w płynach biologicznych.* Wyniki uzyskane podczas monitorowania stężenia leków i ich metabolitów w różnych odstępach czasu od doustnego podania leku wykorzystałam do określenia profilu zmiany stężenia ibuprofenu i jego metabolitów w zależności od czasu [H7].

W pracy H3 podjęłam próbę analizy jakościowej niebadanych do tej pory metabolitów riwaroksabanu [37]. W literaturze tylko w jednej publikacji autorzy podali informacje na temat potencjalnych produktów biotransformacji riwaroksabanu, które mogą występować w próbkach osocza ludzkiego [73]. Wstępne informacje na temat produktów przemian riwaroksabanu zastosowałam w połączeniu z opracowaną przeze mnie procedurą MEPS-UHPLC-MS/MS. W oparciu o pary MRM podane przez autorów pracy [73] w próbkach moczu zidentyfikowałam niektóre z zaproponowanych przez nich struktury M1 (m/z 468→396), M2 (m/z 452→406), M3 (m/z 452→406), M4 (m/z 220→145), M5 (m/z 454→145), M6 (m/z 454→145), M7 (m/z 452→406), M8 (m/z 452→273), M9 (m/z 468→289), M10 (m/z 468→145). Ze względu na brak komercyjnie dostępnych wzorców niemożliwe było przeprowadzenie analizy ilościowej wykrytych w moczu związków. Dodatkowo w badaniach zastosowałam program Lightsight™, który za pomocą specjalnego algorytmu umożliwia znalezienie potencjalnych metabolitów oraz znacznie przyspiesza i ułatwia proces profilowania powstających pochodnych. Za pomocą tego programu potwierdziłam obecność wszystkich zidentyfikowanych w trybie MRM metabolitów riwaroksabanu.

Ze względu na skomplikowane procedury obowiązujące w pozyskiwaniu próbek rzeczywistych z oddziałów szpitalnych opracowane metody zastosowałam jedynie do oznaczania wybranych leków i ich metabolitów w próbkach pochodzących od pacjentów. Otrzymane wyniki wskazują, iż przedstawione powyżej rozwiązania metodyczne z zastosowaniem technik separacyjnych i spektralnych mogą stanowić narzędzie do monitorowania stężeń leków i ich metabolitów w próbkach rzeczywistych. Czułość i selektywność opracowanych procedur analitycznych otrzymana po odpowiednim doborze zarówno parametrów ekstrakcji analitów, jak ich oznaczania (warunków rozdzielania chromatograficznego oraz detekcji) była wystarczająca by w przypadku każdej próbki rzeczywistej móc oznaczyć anality z dobrą precyzją i dokładnością.

Podsumowując, należy stwierdzić, że opracowane metody pozwalają na równoczesne oznaczanie wielu leków z różnych grup terapeutycznych i/lub ich metabolitów w jednym cyklu analitycznym, co może być niezwykle przydatne zarówno w badaniach farmakokinetycznych,

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

jak i w celu badania interakcji typu lek-lek. Znajomość stężeń farmaceutyków i ich metabolitów jest w wielu przypadkach potrzebna, gdyż pozwala oprzeć diagnozę na bardziej obiektywnych przesłankach, ułatwia podjęcie decyzji o indywidualizacji terapii, a w razie zakłóceń metabolizmu o dokonaniu wyboru leku alternatywnego, wyeliminowaniu któregoś z nich bądź wprowadzeniu zmiany w stosowanej terapii.

Drugim zagadnieniem realizowanym w trakcie badań były prace nad poszukiwaniem potencjalnych markerów chorób kardiologicznych [H1, H9]. Po konsultacji z kardiologami wytypowane zostały związki (kwas α -ketoglutaryny oraz L-karnityna i jej estrowe pochodne), które mogłyby pełnić funkcję potencjalnych biomarkerów chorób sercowo-naczyniowych. Opracowane metody UHPLC-MS/MS zastosowałam do analizy próbek moczu pobranych od około 200 pacjentów w wieku od 2 dni do 81 roku życia [35,43]. Zdiagnozowano u nich następujące schorzenia: kardiomiopatię, wrodzone sinicze wady, wrodzone wady serca, zaburzenia rytmu, nadciśnienie płucne i chorobę wieńcową/zawał. Stopień zaawansowania choroby określany w skali NYHA, Rossa był zróżnicowany – od 1 – bez objawów do 4 – skrajnie ciężki. Grupę kontrolną stanowiło 50 osób w wieku od 4 do 78 lat, u których nie stwierdzono żadnych objawów chorób kardiologicznych. Wyniki otrzymane po analizie tak dużej ilości próbek pochodzących od pacjentów pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że możliwe jest zastosowanie opracowanej metody UHPLC-MS/MS do oznaczania L-karnityny, jej acetylowej pochodnej i kwasu α -ketoglutarynowego do badań przesiewowych [H1]. Druga opracowana metoda HILIC-UHPLC-MS/MS do równoczesnego oznaczania L-karnityny i jej sześciu estrowych pochodnych może dostarczyć więcej informacji na temat zmian w układzie sercowo-naczyniowym [H9].

Otrzymane wyniki wskazują jednoznacznie wpływ sposobu odżywiania na poziom stężeń związków, które zaproponowaliśmy jako potencjalne biomarkery. Wpływ składników diety na wyniki oznaczeń L-karnityny i acetylo-L-karnityny stwierdzili w swoich badaniach również inni autorzy [74]. Zdecydowanie lepsze zależności stężeń wybranych związków uzyskałam dla próbek moczu pobranych od noworodków oraz niemowląt, których prosta dieta oparta jest głównie na mleku [43]. Ponadto oznaczenie pochodnych L-karnityny potwierdzały wstępne zależności otrzymane dla poszczególnych związków oznaczonych w moczu pacjentów ze schorzeniami na zróżnicowanym stopniu zaawansowania. Zaobserwowałam na przykład obniżenie zawartości acetylo-L-karnityny w stosunku do ilości L-karnityny dla pacjentów z wrodzonymi sinicznymi wadami i z wrodzonymi wadami serca. W przypadku kardiomiopatii i choroby niedokrwiennej występują widoczne zależności – ze wzrostem acetylo-L-karnityny w moczu występowały wysokie zawartości kwasu α -ketoglutarynowego, przy obniżonej zawartości acetylo-L-karnityny w stosunku do L-karnityny oznaczono niskie zawartości kwasu α -ketoglutarynowego. *Opracowane metody oznaczania potencjalnych markerów pozwoliły ustalić pewne wstępne powiązania analiz/schorzenie i z pewnością mogą na tym etapie znaleźć zastosowanie kliniczne dla szerszej grupy pacjentów ze zdiagnozowanymi schorzeniami sercowo-naczyniowymi.*

Elementy nowości, wkład do dyscypliny i podsumowanie osiągnięcia naukowego

Przedstawiony cykl publikacji [H1–H11] stanowi kompleksowe opracowanie procedur przygotowania próbek biologicznych oraz oznaczania w nich leków i ich metabolitów oraz potencjalnych biomarkerów chorób kardiologicznych. Otrzymane wyniki badań opisane w pracach tworzących jednotematyczny blok publikacji pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia naukowego:

1. Opracowałam selektywne i efektywne metody przygotowania próbek płynów biologicznych z zastosowaniem SPE, MEPS, USAEME oraz SALLE pod kątem izolacji substancji o zróżnicowanym charakterze fizyko-chemicznym, w tym leków z różnych grup terapeutycznych, ich metabolitów oraz kwasu α -ketoglutarynowego, L-karnityny i jej estrowych pochodnych.
2. Dokonałam kompleksowych i systematycznych badań wpływu najważniejszych parametrów na efektywność zastosowanych procedur ekstrakcyjnych w układzie ciało stałe–ciecz, tj. SPE i MEPS (m.in. rodzaj sorbentu, objętość oraz rodzaj rozpuszczalnika stosowanego do elucji, pH oraz objętość próbki) oraz w układzie ciecz–ciecz, tj. USAEME i SALLE (m.in. rodzaj oraz objętość ekstrahenta, rodzaj i masa soli, pH i objętość próbki, czas ekstrakcji).
3. Procedury ekstrakcji analitów z próbek moczu i osocza oraz oczyszczanie matrycy z m.in. wielocząsteczkowych substancji białkowych opracowałam w taki sposób, aby ominąć trudne i czasochłonne postępowanie analityczne proponowane często w literaturze. Dobór parametrów ekstrakcji pozwolił na uzyskanie zadawalających odzysków oznaczanych substancji, a ponadto zapewnił efektywne oczyszczenie ekstraktów, co umożliwiło ilościowe oznaczanie wybranych leków i ich metabolitów oraz potencjalnych markerów chorób kardiologicznych.
4. W celu detekcji oznaczanych związków zastosowałam detektor spektrofotometryczny oraz tandemowy spektrometr mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie. Wykazałam, iż możliwe jest wykorzystanie obu rodzajów detekcji w analizie ilościowej farmaceutyków i ich metabolitów oraz wybranych związków endogennych. Wykazałam, iż po odpowiednim doborze warunków pracy spektrometru mas możliwe jest selektywne oznaczanie analitów na femtomolowych poziomach stężeń.
5. Opracowałam selektywne metody rozdzielania mieszanin ponad 50 różnych związków z zastosowaniem ultra- i wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Zbadałam wpływ faz stacjonarnych otrzymywanych w technologii *core-shell* oraz faz o małych cząstkach (sub-2 μm) pracujących zarówno w odwróconym układzie faz, jak i w układzie HILIC na chromatograficzne rozdzielanie leków, ich metabolitów, L-karnityny i jej estrowych pochodnych. Systematyczne badania nad doбором pozostałych warunków chromatograficznych (m.in. rodzaj fazy ruchomej, program elucji gradientowej, temperatura kolumny) zaowocowały otrzymaniem układów chromatograficznych o dużej sprawności, rozdzielczości i o znacznie krótszym czasie analizy w porównaniu do wyników opisanych dotychczas w literaturze.
6. Wyniki, jakie otrzymałam podczas sprawdzania poprawności działania wszystkich opracowanych metod analitycznych (selektywność, zakres liniowości, LOQ,

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

dokładność, precyzja, odzysk, efekt matrycowy) dowodzą, że można je zakwalifikować do tych, które spełniają wymogi stawiane oznaczeniom ilościowym.

7. Wykazałam możliwość zastosowanie oryginalnych, opracowanych przez mnie procedur analitycznych w oznaczaniu leków z różnych grup terapeutycznych, ich metabolitów oraz potencjalnych markerów chorób kardiologicznych w rzeczywistych próbkach moczu and osocza.

Zakończenie

Realizacja powyższych badań była możliwa dzięki odpowiednim środkom finansowym. Zasadnicza część badań była finansowana z projektów poświęconych udoskonalaniu metod chromatograficznej analizy leków i ich metabolitów, w tym leków nowej generacji stosowanych w kardiologii oraz potencjalnych biomarkerów chorób kardiologicznych: projekt Narodowego Centrum Nauki nr N N204 355840 na lata 2011–2014, projekt Preludium nr 2011/03/N/ST4/00732 na lata 2012–2014 oraz projekt Luventus Plus nr IP2011 032271 na lata 2012–2014. W pierwszym grantie pełniłam funkcję wykonawcy, natomiast w dwóch pozostałych kierownika. Dalsze badania wykonuję w ramach realizowanego obecnie grantu Sonata nr 2011/03/N/ST4/00732 na lata 2015–2018 (jako kierownik projektu), którego głównym celem jest otrzymywanie nowych, oryginalnych, naturalnych rozpuszczalników eutektycznych (NADES, *natural deep eutectic solvents*). Wykorzystanie unikalnych właściwości rozpuszczalników NADES stwarza możliwości rozwoju technik ekstrakcyjnych stosowanych na etapie przygotowania próbek do izolacji związków biologicznie aktywnych (m.in. flawonoidów). Podjęcie przez mnie tego problemu badawczego było możliwe dzięki doświadczeniu w oznaczaniu flawonoidów, które zdobyłam w trakcie realizacji doktoratu oraz w opracowywaniu nowych rozwiązań metodycznych stosowanych na etapie przygotowywania próbek, które poszerzyłam w trakcie realizacji sukcesywnych badań, będących podstawą niniejszej rozprawy habilitacyjnej.

W latach 2010–2016 brałam także udział w badaniach z zakresu analizy związków polifenolowych w płynach biologicznych, w żywności i w suplementach diety, pozostałości środków bakteriobójczych w wodach powierzchniowych oraz stereoselektywnego oznaczania enancjomerów leków β -adrenolitycznych, ich metabolitów oraz enancjomerów wybranych flawonoidów. Wyniki tych badań były regularnie publikowane w czasopiśmie o zasięgu ogólnościowym.

W 2012 roku zostałam wyróżniona trzyletnim Stypendium Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców. W 2014 roku uzyskałam Nagrodę Komitetu Chemii Analitycznej Polskiej Akademii Nauk „*Za najlepszą pracę doktorską w dziedzinie chemii analitycznej związaną z rozwojem technik rozdzielania*”. Natomiast w 2012 roku otrzymałam Nagrodę Zespołową JM Rektora Politechniki Śląskiej za osiągnięcia uzyskane w dziedzinie naukowo-badawczej oraz Stypendium Fundacji im. Jana Binkiewicza przyznane w kategorii „*Stypendium dla wyróżniających się adiunktów, asystentów i uczestników studiów doktoranckich*” Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej.

Literatura

1. I. Baranowska, **S. Magiera**, J. Baranowski, *Ultra HPLC method for the simultaneous analysis of drugs and flavonoids in human urine*. Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies, 34 (2011) 421–435.
2. I. Baranowska, **S. Magiera**, *Analysis of isoflavones and flavonoids in human urine by UHPLC*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 399 (2011) 3211–3219.
3. I. Baranowska, **S. Magiera**, J. Baranowski, *UHPLC method for the simultaneous determination of β -blockers, isoflavones and their metabolites in human urine*. Journal of Chromatography B, 879 (2011) 615–626.
4. I. Baranowska, **S. Magiera**, *Development and validation of an UHPLC method for the determination of flavonoids in red wine*. Journal of AOAC International, 94 (2011) 786–794.
5. **S. Magiera**, C. Uhlschmied, M. Rainer, Ch. Huck, I. Baranowska, G. Bonn, *GC–MS method for the simultaneous determination of β -blockers, flavonoids, isoflavones and their metabolites in human urine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 56 (2011) 93–102.
6. I. Baranowska, **S. Magiera**, J. Baranowski, *UHPLC method for the simultaneous determination of β -blockers, isoflavones and flavonoids in human urine*. Journal of Chromatographic Science, 49 (2011) 764–773.
7. I. Baranowska, **S. Magiera**, J. Baranowski, *Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of isoflavones from urine and plasma by liquid chromatography*. Central European Journal of Chemistry, 9 (2011) 972–981.
8. **S. Magiera**, I. Baranowska, J. Kusa, *Development and validation of UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of selected cardiovascular drugs, polyphenols and their metabolites in human urine*. Talanta, 89 (2012) 47–56.
9. R. Cermak, S. Wolfram, *The potential of flavonoids to influence drug metabolism and pharmacokinetics by local gastrointestinal mechanisms*. Current Drug Metabolism, 7 (2006) 729–744.
10. R. Cermak, *Effect of dietary flavonoids on pathways involved in drug metabolism*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 4 (2008) 17–35.
11. A.S. Jaffe, L. Babuin, F.S. Apple, *Biomarkers in Acute Cardiac Disease The Present and the Future*. Journal of the American College of Cardiology, 48 (2006) 1–11.
12. B. Zethelius, L. Berglund, J. Sundström, E. Ingelsson, S. Basu, A. Larsson, P. Venge, J. Ärnlöv, *Use of Multiple Biomarkers to Improve the Prediction of Death from Cardiovascular Causes*. New England Journal of Medicine, 358 (2008) 2107–2116.
13. Biomarkers Definitions Working Group. *Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 69 (2001) 89–95.
14. S.A. Halim, L.K. Newby, E.M. Ohman, *Biomarkers in Cardiovascular Clinical Trials: Past, Present, Future*. Clinical Chemistry, 58 (2012) 45–53.
15. C.E. Brown, N.S. McCarthy, A.D. Hughes, P. Sever, A. Stalmach, W. Mullen, A.F. Dominiczak, N. Sattar, H. Mischak, S. Thom, J. Mayet, A.V. Stanton, C. Delles, *Urinary proteomic biomarkers to predict cardiovascular events*. Proteomics – Clinical Applications, 9 (2015) 610–617.
16. G.S. Ginsburg, J.J. McCarthy, *Personalized medicine: revolutionizing drug Discovery and patient care*. Trends in Biotechnology, 19 (2001) 491–496.
17. M.A. Hamburg, F.S. Collins, *The path to Personalized Medicine*. The New England Journal of Medicine, 10 (2010) 1–4.
18. E. Gerald, J.T. Barr, *Therapeutic Drug Monitoring Do the Improved Outcomes Justify the Costs?* Clinical Pharmacokinetics, 40 (2001) 405–409.
19. T.J. Campbell, K.M. Williams, *Therapeutic drug monitoring: antiarrhythmic drugs*. The Journal of Clinical Pharmacology, 52 (2001) 21S–34S.
20. A.S. Gross, *Best practice in therapeutic drug monitoring*. British Journal of Clinical Pharmacology, 46 (1998) 95–99.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

21. I.D. Wilson, R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, E.M. Lenz, *HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics*. Journal of Chromatography B, 817(2005) 67–76.
22. M. Vogeser, Ch. Seger, *A decade of HPLC–MS/MS in the routine clinical laboratory — Goals for further developments*. Clinical Biochemistry, 41 (2008) 649–662.
23. Y. Hsieh, *HPLC-MS/MS in drug metabolism and pharmacokinetic screening*. Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology, 4 (2008) 93–101.
24. P. Jonsson, J. Gullberg, A. Nordström, M. Kusano, M. Kowalczyk, M. Sjöström, T. Moritz, *A Strategy for Identifying Differences in Large Series of Metabolomic Samples Analyzed by GC/MS*. Analytical Chemistry, 76 (2004) 1738–1745.
25. I. Baranowska, **S. Magiera**, J. Baranowski, *Clinical applications of fast liquid chromatography: A review on the analysis of cardiovascular drugs and their metabolites*. Journal of Chromatography B, 927 (2013) 54–79.
26. S. Fekete, J. Schappler, J.L. Veuthey, D. Guillarme, *Current and future trends in UHPLC*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 63 (2014) 2–13.
27. L. Denoroy, L. Zimmer, B. Renaud, S. Parrot, *Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review*. Journal of Chromatography B, 927 (2013) 37–53.
28. L. Nováková, H. Vlčková, *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 656 (2009) 8–35.
29. J. Cielecka-Piontek, P. Zalewski, A. Jelińska, P. Garbacki, *UHPLC: The Greening Face of Liquid Chromatography*. Chromatographia, 76 (2013) 1429–1437.
30. G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 25 (2006) 692–703.
31. M. Abdel-Rehim, *Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis*. Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 2569–2580.
32. K. Farhadi, M. Hatami, A.A. Matin, *Microextraction techniques in therapeutic drug monitoring*. Biomedical Chromatography, 26 (2012) 972–989.
33. E. Baltussen, C. Cramers, P. Sandra, *Sorptive sample preparation – a review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 373 (2002) 3–22.
34. M.S. Chang, Q. Ji, J. Zhang, T.A. El-Shourbagy, *Historical review of sample preparation for chromatographic bioanalysis: pros and cons*. Drug Development Research, 68 (2007) 107–133.
35. **[H1] S. Magiera**, I. Baranowska, J. Kusa, J. Baranowski, *A liquid chromatography and tandem mass spectrometry method for the determination of potential biomarkers of cardiovascular disease*. Journal of Chromatography B, 919–920 (2013) 20–29.
36. **[H2] S. Magiera**, Ş. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska, *Application of statistical experimental design to the optimisation of microextraction by packed sorbent for the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human urine by ultra-high pressure liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1304 (2013) 1–9.
37. **[H3] S. Magiera**, *Fast, simultaneous quantification of three novel cardiac drugs in human urine by MEPS-UHPLC-MS/MS for therapeutic drug monitoring*. Journal of Chromatography B, 938 (2013) 86–95.
38. **[H4] S. Magiera**, I. Baranowska, *A rapid method for determination of 22 selected drugs in human urine by UHPLC-MS/MS for clinical application*. Journal of AOAC International, 97 (2014) 1526–1537.
39. **[H5] S. Magiera**, J. Hejniak, J. Baranowski, *Comparison of different sorbent materials for solid-phase extraction of selected drugs in human urine analyzed by UHPLC-UV*. Journal of Chromatography B, 958 (2014) 22–28.
40. **[H6] S. Magiera**, I. Baranowska, *A new and fast strategy based on a semi-automatic microextraction by packed sorbent followed by ultra-high performance liquid chromatography for analysis of drugs and their metabolites in human urine*. Journal of Separation Science, 37 (2014) 3314–3320.
41. **[H7] S. Magiera**, Ş. Gülmez, *Ultrasound-assisted emulsification microextraction combined with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of*

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

- ibuprofen and its metabolites in human urine*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 92 (2014) 193–202.
42. [H8] S. Magiera, J. Kusa, *Evaluation of a rapid method for the therapeutic drug monitoring of aliskiren, enalapril and its active metabolite in plasma and urine by UHPLC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 980 (2015) 79–87.
 43. [H9] S. Magiera, J. Baranowski, *Determination of carnitine and acylcarnitines in human urine by means of microextraction in packed sorbent and hydrophilic interaction chromatography-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 109 (2015) 171–176.
 44. [H10] S. Magiera, A. Pardyła, I. Baranowska, *Effects of various factors of ultrasonic treatment on the extraction recovery of drugs from fish tissues*. Ultrasonics Sonochemistry, 26 (2015) 388–398.
 45. [H11] S. Magiera, A. Kolanowska, J. Baranowski, *Salting-out assisted extraction method coupled with hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of selected β -blockers and their metabolites in human urine*. Journal of Chromatography B, 1022 (2016) 93–101.
 46. K. Heinig, J. Henion, *Determination of carnitine and acylcarnitines in biological samples by capillary electrophoresis–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 735 (1999) 171–188.
 47. F. Waldmeier, U. Glaenzel, B. Wirz, L. Oberer, D. Schmid, M. Seiberling, J. Valencia, G.J. Riviere, P. End, S. Vaidyanathan, *Absorption, distribution, metabolism, and elimination of the direct renin inhibitor aliskiren in healthy volunteers*. Drug Metabolism and Disposition 35 (2007) 1418–1428.
 48. N.A. Farid, M. McIntosh, F. Garofolo, E. Wong, A. Shwajch, M. Kennedy, M. Young, P. Sarkar, K. Kawabata, M. Takahashi, H. Pang, *Determination of the active and inactive metabolites of prasugrel in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 21 (2007) 169–179.
 49. G. Rohde, *Determination of rivaroxaban--a novel, oral, direct Factor Xa inhibitor--in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 872 (2008) 43–50.
 50. L. Kristoffersen, E.L. Øiestad, M.S. Opdal, M. Krogh, E. Lundanes, A.S. Christophersen, *Simultaneous determination of 6 beta-blockers, 3 calcium-channel antagonists, 4 angiotensin-II antagonists and 1 antiarrhythmic drug in post-mortem whole blood by automated solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry: Method development and robustness testing by experimental design*. Journal of Chromatography B, 850 (2007) 147–160.
 51. Irena Baranowska, Andrzej Wilczek, Jacek Baranowski, *Rapid UHPLC Method for Simultaneous Determination of Vancomycin, Terbinafine, Spironolactone, Furosemide and Their Metabolites: Application to Human Plasma and Urine*. Analytical Sciences, 26 (2010) 755–759.
 52. M. Mazzarino, X. Torre, F. Mazzei, F. Botrè, *Rapid screening of beta-adrenergic agents and related compounds in human urine for anti-doping purpose using capillary electrophoresis with dynamic coating*. Journal of Separation Science, 32 (2009) 3562–3570.
 53. J.H. Miller, P.A. Poston, H.T. Karnes, *A quantitative method for acylcarnitines and amino acids using high resolution chromatography and tandem mass spectrometry in newborn screening dried blood spot analysis*. Journal of Chromatography B, 903 (2012) 142–149.
 54. P.E. Minkler, J. Kerner, K.N. North, Ch.L. Hoppel, *Quantitation of long-chain acylcarnitines by HPLC/fluorescence detection: application to plasma and tissue specimens from patients with carnitine palmitoyltransferase-II deficiency*. Clinica Chimica Acta, 352 (2005) 81–92.
 55. L. Vernez, M. Wenk, S. Krähenbühl, *Determination of carnitine and acylcarnitines in plasma by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry*, Rapid Communications in Mass Spectrometry, 18 (2004) 1233–1238.
 56. Z. Altun, M. Abdel-Rehim, *Study of the factors affecting the performance of microextraction by packed sorbent (MEPS) using liquid scintillation counter and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 630 (2008) 116–123.
 57. G. Alves, M. Rodrigues, A. Fortuna, A. Falcão, J. Queiroz, *A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis*. Bioanalysis, 5 (2013) 1409–1442.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

58. J. Li, L. Wang, S. Wang, M. Chen, E. Gu, G. Hu, R. Ge, *Simultaneous quantification of carvedilol and its metabolites in rat plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and pharmacokinetic application*. Journal of Chromatography B, 2015 (974) 138–146.
59. A. Zarghi, S.M. Foroutan, A. Shafaati, A. Khoddam, *Quantification of carvedilol in human plasma by liquid chromatography using fluorescence detection: Application in pharmacokinetic studies*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 44 (2007) 250–253.
60. M.L. Della Bona, S. Malvagia, F. Villanelli, E. Giocaliere, D. Ombrone, S. Funghini, L. Filippi, G. Cavallaro, P. Bagnoli, R. Guerrini, G. la Marca, *A rapid liquid chromatography tandem mass spectrometry-based method for measuring propranolol on dried blood spots*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 78–79 (2013) 34–38.
61. S. Velghe, S. Capiou, Ch.P. Stove, *Opening the toolbox of alternative sampling strategies in clinical routine: A key-role for (LC-)MS/MS*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, doi:10.1016/j.trac.2016.01.030.
62. B. Yilmaz, A. Asci, S. Arslan, *Determination of metoprolol in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection*. Journal of Separation Science, 33 (2010) 1904–1908.
63. P. Gavra, A.Q.N. Nguyen, N. Beauregard, A.Y. Denault, F. Varin, *High-performance liquid chromatography assay using ultraviolet detection for urinary quantification of milrinone concentrations in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass*. Biomedical Chromatography, 28 (2014) 1084–1089.
64. Z. Ateş, T. Özden, S. Özilhan, S. Toptan, *Simultaneous Determination of Carbamazepine and its Active Metabolite Carbamazepine-10,11-epoxide in Human Plasma by UPLC*. Chromatographia, 66 (2007) 123–127.
65. D.P. Patel, P. Sharma, M. Sanyal, P. Singhal, P.S. Shrivastav, *UPLC-MS/MS assay for the simultaneous quantification of carvedilol and its active metabolite 4'-hydroxyphenyl carvedilol in human plasma to support a bioequivalence study in healthy volunteers*. Biomedical Chromatography, 27 (2013) 974–986.
66. K. Deventer, P. Van Eenoo, F.T. Delbeke, *Simultaneous determination of beta-blocking agents and diuretics in doping analysis by liquid chromatography/mass spectrometry with scan-to-scan polarity switching*. Rapid Communications in Mass Spectrometry, 19 (2005) 90–98.
67. G.J. Murray, J.P. Danaceau, *Simultaneous extraction and screening of diuretics, beta-blockers, selected stimulants and steroids in human urine by HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS*. Journal of Chromatography B, 877 (2009) 3857–3864.
68. I. Baranowska, A. Wilczek, *A rapid UHPLC method for the simultaneous determination of selected β -blockers, NSAIDs and their metabolites in human urine and water samples*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33 (2010) 1776–1790.
69. U. Chiuminatto, F. Gosetti, P. Dossetto, E. Mazzucco, D. Zampieri, E. Robotti, M.C. Gennaro, E. Marengo, *Automated Online Solid Phase Extraction Ultra High Performance Liquid Chromatography Method Coupled with Tandem Mass Spectrometry for Determination of Forty-Two Therapeutic Drugs and Drugs of Abuse in Human Urine*. Analytical Chemistry, 82 (2010) 5636–5645.
70. I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, *Development and Validation of an HPLC Method for the Simultaneous Analysis of 23 Selected Drugs Belonging to Different Therapeutic Groups in Human Urine Samples*. Analytical Sciences, 25 (2009) 1307–1313.
71. K. Li, W. Li, Y. Huang, *Determination of free L-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility*. Clinica Chimica Acta, 378 (2007) 159–163.
72. Ch.J. McEntyre, M. Lever, M.K. Storer, *A high performance liquid chromatographic method for the measurement of total carnitine in human plasma and urine*. Clinica Chimica Acta, 344 (2004) 123–130.

Załącznik 3A

do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

73. D. Lang, C. Freudenberger, C. Weinz, *In vitro metabolism of rivaroxaban, an oral, direct factor Xa inhibitor, in liver microsomes and hepatocytes of rats, dogs, and humans*. Drug Metabolism and Disposition, 37 (2009) 1046–1055.
74. G. Cederblad, *Effect of diet on plasma carnitine levels and urinary carnitine excretion in humans*. American Journal of Clinical Nutrition, 45 (1987) 725–729.

Sylvia Magiera