

**Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**

**AUTOREFERAT**

**Omówienie osiągnięć w działalności naukowo-badawczej**

Katedra i Zakład Chemii Fizycznej  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny  
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Wiesław Sawicki

Studia ukończyłam w 1990 roku na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku na kierunku Farmacja o specjalności analityka farmaceutyczna. Pracę magisterską pod tytułem: „Badania nad ilościowym oznaczaniem glinu” wykonałam w Pracowni Analizy Instrumentalnej Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej. Tytuł zawodowy magistra farmacji uzyskałam 10 października 1990 roku. Od 11 grudnia 1989 roku, będąc studentką V roku Farmacji, zostałam zatrudniona w Pracowni Analizy Instrumentalnej Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej Akademii Medycznej w Gdańsku na stanowisku asystenta stażysty, a od 1990 roku na stanowisku asystenta. W latach 1992-1995 podjęłam dodatkowo pracę w Aptece „Dominikańska” w Gdańsku. Po odbyciu stażu aptecznego w 1996 roku uzyskałam prawo samodzielnego wykonywania zawodu aptekarza. Zdobyte doświadczenie w aptece otwartej stało się pomocne w pracy dydaktycznej ze studentami, dostarczając przykłady do dyskusji. Pracę doktorską pod tytułem: „Ocena zawartości związków krzemu w środkach spożywczych”, wykonaną pod kierunkiem kierownika Pracowni Analizy Instrumentalnej Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej prof. dr. hab. Jerzego Łukasiaka, obroniłam z wyróżnieniem 7 grudnia 1999 roku. Od 1 marca 2000 roku jestem zatrudniona na stanowisku adiunkta w Katedrze i Zakładzie Chemii Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

## **Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora**

Początki mojej działalności naukowej wiążę z realizacją pracy dyplomowej pt: „Badania nad ilościowym oznaczaniem glinu”, którą wykonałam pod kierunkiem prof. dr. hab. n. farm. Wojciecha Łukasiaka, a którą obroniłam w 1990 roku na Wydziale Farmaceutycznym Akademii Medycznej w Gdańsku, uzyskując tytuł magistra farmacji o specjalności analityka farmaceutyczna. W zakresie moich zainteresowań były zagadnienia związane z analizą pierwiastków śladowych. Zajmowałam się tematyką monitoringu jonów glinowych zarówno w środowisku naturalnym, jak i płynach ustrojowych człowieka. Współpracując z zespołem zatrudnionym w Pracowni Analizy Instrumentalnej Katedry i Zakładu Chemii Fizycznej Akademii Medycznej w Gdańsku, w której kierownikiem był prof. dr. hab. Jerzy Łukasiak, oraz Katedry i Kliniki Nefrologii, Transplantologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Gdańsku, w której kierownikiem był prof. dr. hab. Bolesław Rutkowski, poszukiwałam rozwiązań w eliminowaniu zanieczyszczeń płynów dializacyjnych, wynikających z obecności jonów glinowych. Według ówczesnej hipotezy jony te mogły przyczyniać się do neuropatii występującej u pacjentów dializowanych, jak również rozwoju choroby Alzheimera. Uczestniczyłam w badaniach szybkości

dyfuzji przez błonę dializacyjną jonu  $Al^{3+}$  oraz kompleksu jonu  $Al^{3+}$  z desferoksaminą (Desferalem), która stosowana jest w leczeniu zatruc żelazem.

Interesowało mnie także rozwiązywanie problemów analitycznych, a w szczególności opracowywanie nowych procedur oznaczania analitów z grupy pierwiastków śladowych. Efektem moich działań było otrzymanie stabilnych kompleksów jonów glinowych i żelazowych z desferoksaminą w odpowiednim zakresie pH. Umożliwiło to opracowanie równoczesnego oznaczania w próbce tych jonów z wykorzystaniem wybiórczego chelatora metodą spektroskopii UV-Vis. Przydatność tej metody wykazałam na podstawie badań zawartości jonów glinowych i żelazowych w wodach naturalnych: powierzchniowych i podziemnych oraz w wodach pitnych.

Brałam również aktywny udział w badaniach zespołu dotyczących otrzymywania selektywnych, w stosunku do jonów glinowych i żelazowych, sorbentów w wyniku immobilizowania desferoksaminy na kationitach i krzemionce. W przypadku wypełnień krzemionkowych badania były kontynuowane we współpracy z Zakładem Technologii Chemicznej Uniwersytetu Gdańskiego, w którym kierownikiem był prof. dr hab. Andrzej Kłonkowski. Celem była próba zastosowania przedkolumny w procesie dializy, której wypełnienie z immobilizowaną desferoksaminą miało spowodować oczyszczenie płynu dializacyjnego z jonów glinowych poprzez tworzenie chelatów, zanim zostanie on podany pacjentowi.

Zainteresowanie pierwiastkami śladowymi było dla mnie ważne zarówno z punktu widzenia korzystnego oddziaływania na organizm, jak i toksycznego. W każdym przypadku dostrzegałam konieczność stosowania metod specyficznych i selektywnych, które wyróżniają się jak najniższą granicą oznaczalności. W tym obszarze badań brałam udział przy opracowaniu metody równoczesnego oznaczania metali Pb, Cd, Zn, Cu przy wykorzystaniu techniki chronowoltamperometrycznej. Ponadto w zakresie badań było także opracowanie metody oznaczania Cu w próbkach biologicznych pochodzących od osób z zaburzonym metabolizmem tego pierwiastka, diagnozowanym jako choroba Wilsona, przy wykorzystaniu techniki atomowej spektrometrii absorpcyjnej (ASA).

W pracy badawczej istotny był dla mnie aspekt nie tylko analityczny, polegający na poszukiwaniu nowych rozwiązań, ale także pożyteczny dla pacjenta i lekarza. Znacznym osiągnięciem badawczym we współpracy, w latach 1990-1993, z Kliniką Nadciśnienia Tętniczego i Diabetologii Akademii Medycznej w Gdańsku, w której kierownikiem była prof. dr hab. Barbara Krupa-Wojciechowska, było opracowanie metodyki postępowania analitycznego, przydatnego do wyznaczania aktywności przeciwtransportu sodowo-litowego w erytrocytach. Pomiar aktywności oraz obserwacja jej wzrostu stała się przydatna w ocenie ryzyka nefropatii w przebiegu cukrzycy

insulinozależnej, występującej u dzieci i osób dorosłych, jak również stała się wykładnikiem, genetycznie uwarunkowanej, predyspozycji do pierwotnego nadciśnienia tętniczego.

W roku 1994 brałam także udział w trwających już badaniach we współpracy z Instytutem Chemii Przemysłowej z Warszawy, których efektem było stwierdzenie podatności na biodegradację niektórych silikonów. W świetle ówczesnych danych literaturowych istniało przekonanie o trwałości wiązań i niepodatności na biodegradację tych polimerów krzemoorganicznych. Z tego względu rezultaty badań okazały się istotne, ukazując w nowym świetle właściwości fizykochemiczne silikonów.

W tym czasie kształtował się temat wiodący moich prac. Najważniejsze zagadnienia związane były z problematyką analityki specyacyjnej związków krzemu, którą przedstawiłam w pracy doktorskiej, zatytułowanej „Ocena zawartości związków krzemu w środkach spożywczych”. W próbkach żywności poszukiwałam związków krzemu, które mogły występować jako naturalny składnik, celowy dodatek lub zanieczyszczenie. W ramach badań opracowałam schemat specjacji związków krzemu pochodzenia organicznego i nieorganicznego. Ten rodzaj analizy związków krzemu nie był dotychczas stosowany. Przygotowałam także procedury izolowania analitów z różnych matryc oraz metodykę zmydlania tłuszczów jadalnych zawierających polidimetylosiloksany, która stanowiła etap oddzielania i wzbogacania analitów. Ponadto opracowałam metody analityczne oznaczania związków krzemu pochodzenia organicznego i nieorganicznego przy wykorzystaniu technik pomiarowych, do których należały: spektroskopia w zakresie IR i UV-Vis oraz ASA. Najważniejszym efektem tej pracy było opracowanie procedury analitycznej w oparciu o spektroskopię protonowego magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H-NMR}$ ), która okazała się przydatna w identyfikacji PDMS o strukturze liniowej oraz badaniach ilościowych w skomplikowanych matrycach, jakim była żywność. Metodę tę zakwalifikowałam jako przydatną w analizie specyacyjnej związków krzemoorganicznych w porównaniu do powszechnie stosowanych. Dotychczasowy warsztat analityczny wyróżniał się zbyt wysoką granicą oznaczalności i ograniczoną specyficznością, co uniemożliwiało identyfikację analitu w wybranych matrycach. Należy nadmienić, że prezentowana w rozprawie doktorskiej metodyka analityczna nie była wcześniej opublikowana przez innych badaczy i nosiła znamiona nowości naukowej. Rozprawę doktorską obroniłam 7 grudnia 1999 roku. Promotorem pracy był prof. dr hab. n. farm. Wojciech Łukasiak, recenzentami zaś byli prof. dr hab. Jerzy Siepak z Wydziału Chemii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz prof. dr hab. Zenon Ganowiak z Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku, obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Rozprawa doktorska została wyróżniona przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku.

## Osiągnięcia naukowe po uzyskaniu stopnia doktora

określone w przepisie art.16, ust. 1 i 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, z późn. zm.)

Zarówno wyniki wcześniejszych badań, jak i przegląd piśmiennictwa skłoniły mnie do szczególnego zainteresowania się polidimetylosiloksanami (PDMS). Było to związane między innymi ze świadomością powszechnego ich stosowania w różnych dziedzinach życia. Kontakt bezpośredni człowieka z PDMS to przede wszystkim: produkty lecznicze i wyroby medyczne, materiały medyczne (np. implanty, protezy, endotamponady gałki ocznej, silanizowane powierzchnie strzykawek, cewników), żywność (jako dodatek funkcjonalny o symbolu E-900), kosmetyki oraz środowisko poprzez wodę i glebę, w których obecne są jako zanieczyszczenie. Jako główny obszar moich zainteresowań wybrałam produkty lecznicze i wyroby medyczne.

Cel pracy został wyznaczony na podstawie kilku aspektów, które uznałam, jako problematykę kontroli analitycznej PDMS stosowanych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych. Z uwagi na to, że stały się one istotnymi przesłankami do podjęcia nowego etapu badań, uważam za zasadne ich zaprezentowanie.

### SPIS PUBLIKACJI BĘDĄCYCH PRZEDMIOTEM OSIĄGNIĘĆ

Zaprezentowane osiągnięcia stanowią jednotematyczny cykl ośmiu publikacji o łącznej wartości wskaźnika IF=16,957.

- 1) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**, Jerzy Łukasiak. Polidimetylosiloksany jako substancja czynna preparatów farmaceutycznych. *Farmacja Polska*, 2005, 61, 22, 1041- 1044.
- 2) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**, Jerzy Łukasiak. Problematyka związana z niektórymi kierunkami zastosowania polidimetylosiloksanów oraz możliwości analizy tych związków. *Polimery*, 2006, 51, 3, 186-191. IF = 1,137.
- 3) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. Size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection: Method for determination of polydimethylsiloxanes.  
I. Testing dependence of molecular weight of polydimethylsiloxanes and injected mass upon the detector signal. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, 1-6. IF = 2,500.
- 4) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. Size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection: Method for determination of polydimethylsiloxanes.  
II. Application of TSK-GEL H<sub>HR</sub>GMH<sub>HR</sub>\_M column to determine and separate molecular weight of linear polydimethylsiloxanes. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, 7-12. IF = 2,500.
- 5) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. On the Issue of Characteristic Evaporative Light Scattering Detector Response. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2009, 39, 89-94. IF = 2,621.

6) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

I: Influence of selected factors on the signal intensity of the detector.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53, 3, 503-509. IF = 2,733.

7) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

II: Validation of the method for analysis of pharmaceutical formulations.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 56, 4, 851-858. IF = 2,733.

8) **Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska**. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

III: Identification and determination dimeticone and simeticone in pharmaceutical formulation.

Manuskrypt w druku w czasopiśmie *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.09.003. IF = 2,733.

## WPROWADZENIE

### Problematyka polidimetylosiloksanów w aspekcie chemicznym

Polidimetylosiloksany należą do polimerów krzemoorganicznych, a ściślej do ważnej ich grupy – polisiloksanów. Polisiloksany potocznie nazywane są silikonami lub polimerami silikonowymi. Właściwą strukturę polisiloksanów tworzy powtarzająca się grupa siloksanowa (–Si–O–), tzw. szkielet siloksanowy. Do niego przyłączone są różne ugrupowania organiczne. W zależności od geometrycznej charakterystyki cząsteczki (liniowa, rozgałęziona, usieciowana), a także od rodzaju grup funkcyjnych związanych ze szkieletem siloksanowym, silikonami mogą być cieciami o różnym stopniu polimeryzacji, żywicami o różnej konsystencji, kauczukami lub elastomerami. W przypadku PDMS strukturę tworzą grupy dwufunkcyjne:  $-(R_2Si-O)-$ , w której podstawnik R jest grupą metylową. Struktura może być liniowa lub cykliczna [1-3].

W mojej pracy przedmiotem badań były PDMS o strukturze liniowej, które różniły się między sobą stopniem polimeryzacji (różna liczba merów w cząsteczce – n), który determinuje ciężar cząsteczkowy i lepkość. Ze względu na specyfikę reakcji polimeryzacji, która jest przyczyną powstania łańcuchów o różnej liczbie merów w cząsteczce, należy otrzymany produkt traktować jako mieszaninę polimerów, a nawet oligomerów, o łańcuchach różnej długości, a tym samym ciężarach cząsteczkowych. W każdej próbce polimeru istnieje jednak przeważająca ilość frakcji o konkretnym ciężarze cząsteczkowym, zwana frakcją dominującą [4]. Można tę frakcję wyodrębnić przy użyciu technik oczyszczania, które są jednak kosztowne. W większości przypadków polimery, w tym PDMS, nie są konkretnym indywiduum chemicznym.

## Problematyka polidimetylosiloksanów w aspekcie analizy specjacyjnej

W naukach chemicznych termin specjacja zaczął funkcjonować na początku lat 80-tych XX wieku [5,6]. Od tego momentu specjacja i analiza specjacyjna zaczęła kształtować się jako dziedzina badań. Należy zdecydowanie podkreślić jej rangę, ponieważ jest istotna nie tylko w obszarze chemii analitycznej. Badania nad specjacją przyczyniły się do rozwoju także innych dziedzin nauki. Do najważniejszych należy farmacja, medycyna, toksykologia, bromatologia, czy ochrona środowiska.

Według definicji, rekomendowanej przez IUPAC, specjacja to – *dystrybucja pierwiastka jako indywidualów chemicznych w danym układzie* [7]. Jednak najczęściej używa się definicji specjacji, jako – *występowanie różnych fizycznych i chemicznych form danego pierwiastka, indywidualów w badanym materiale* [6]. Zaś analiza specjacyjna – to *identyfikacja i/lub oznaczanie jednego lub więcej indywidualów w próbce* [7].

Analiza specjacyjna należy do dziedzin wiedzy, która na przestrzeni lat znacznie się rozwinęła. W jej obrębie powstało wiele nowych rodzajów, np.: specjacja chemiczna, fizyczna, grupowa, szczegółowa, indywidualna, funkcjonalna, dystrybucyjna, operacyjna, chiralna, czy też cytologiczna [6-9]. W tym względzie sformułowanie jednolitej definicji specjacji i analizy specjacyjnej jest bardzo trudne. Wprowadzenie różnorodnych pojęć okazało się konieczne, kiedy stwierdzono, że oznaczenie całkowitego stężenia danego pierwiastka nie daje satysfakcjonującej odpowiedzi na temat jego działania. Szczegółowe badania ujawniły, iż szereg pierwiastków wykazuje zróżnicowane właściwości w zależności od tego, czy występuje np. w formie organicznej, czy nieorganicznej, wolnej czy zjonizowanej, a także od ich stopnia utlenienia [6]. W zależności od połączeń chemicznych danego pierwiastka, odmian polimorficznych, czy izomerycznych substancji, indywiduala chemiczne posiadają zróżnicowane właściwości pod względem, np.: dostępności biologicznej, właściwości terapeutycznych, aktywności biologicznej, zdolności do migracji przez bariery komórkowe, toksyczności oraz biokumulacji. Problematyka specjacji nabrała znaczenia szczególnie w kontekście toksykologicznym i zdrowotnym.

Kształtowanie się różnych rodzajów analizy specjacyjnej jest zatem zrozumiałe i prawidłowe, ponieważ właściwe podejście do badań powinien wyznaczyć konkretny cel przedsięwzięcia, jak i możliwości warsztatu analitycznego. W przypadku analizy specjacyjnej grupowej wystarczy informacja o występowaniu danego pierwiastka, a już nie jest istotne w jakich układach strukturalnych. Czasem jednak musimy poznać, czy występuje konkretny związek chemiczny o właściwościach terapeutycznych lub silnie toksycznych i w jakim stężeniu. Taka analiza specjacyjna określana jest jako szczegółowa, a nawet indywidualna.

Także w przypadku PDMS, które pełnią rolę między innymi substancji czynnej w lekach, należy stosować analizę specjacyjną. Jak już wspomniałam, posiadają one w swojej strukturze powtarzający się fragment, zwany merem. Im większy stopień polimeryzacji (liczba  $n$ ), tym większy ciężar cząsteczkowy i lepkość. Z tego względu PDMS można podzielić na: niskocząsteczkowe, średnicząsteczkowe i wielocząsteczkowe. W związku z tym, że PDMS nie są ściśle określonym indywiduum chemicznym, który posiada konkretną wartość ciężaru cząsteczkowego, należy stosować takie metody analityczne, które będą charakteryzowały się nie tylko selektywnością, ale przede wszystkim specyficznością. Warunek ten umożliwi także przeprowadzenie analizy specjacyjnej. Przy wykorzystaniu tych metod należy dążyć do wyznaczania ciężarów cząsteczkowych PDMS, występującego w produktach leczniczych i wyrobach medycznych. Ważne będzie w tym przypadku wyznaczenie stopnia polidispersji lub określenie ciężaru cząsteczkowego PDMS frakcji przeważającej. Umożliwi to zakwalifikowanie polimeru pod względem wielkości cząsteczki do odpowiedniej grupy. Zasadność przeprowadzania analizy specjacyjnej i stosowanie w tym przypadku metod specyficznych jest szczególnie ważne w aspekcie toksykologicznym niektórych PDMS.

### **Problematyka polidimetylosiloksanów w aspekcie toksykologicznym**

W kontekście przeglądu piśmiennictwa pod kątem bezpieczeństwa stosowania polisiloksanów (silikonów), do których należą PDMS, zgromadzonego na przestrzeni lat 1948–2011, można zauważyć, że istnieje problem z odpowiedzią na pytanie: *Czy silikon są bezpieczne dla człowieka oraz w jakim stopniu oddziałują na organizm?*

Badania związane z oceną wpływu silikonów na organizm ludzki rozpoczęły się od momentu wprowadzenia ich do użytku, a więc w latach 40–tych XX wieku. Od tamtego czasu zwiększyła się zarówno liczba wyrobów zawierających ten polimer, jak i obszar ich stosowania. Było to powodem rozpoczęcia badań związanych z oceną ewentualnej toksyczności. Otrzymane rezultaty, jak i wnioski są nie tylko niejednoznaczne, ale bywają także sprzeczne. Przez długi czas polisiloksany uważane były za polimery nietoksyczne, które charakteryzują się obojętnością fizjologiczną oraz niepodatnością na biodegradację. Jednak obserwacje epidemiologiczne oraz rezultaty badań doświadczalnych zmusiły specjalistów do weryfikacji tych poglądów.

Na przestrzeni lat prowadzono wielokierunkowe badania związane z oceną wpływu polimerów silikonowych na organizmy, biorąc pod uwagę strukturę (liniową lub cykliczną), ciężar cząsteczkowy oraz drogę podania. Głównie były to badania krótkoterminowe w celu określenia działania teratogennego, embriotoksycznego i wpływu na rozrodczość. Ponadto prowadzono badania długoterminowe, w dziedzinie toksykologii molekularnej, które miały wykryć lub wykluczyć genotoksyczność. Dokonywano oceny kancerogenności oraz wpływu tych polimerów



na układ immunologiczny. Interesowano się także możliwościami przenikania silikonów przez bariery komórkowe i penetracji do różnych tkanek i narządów.

Jako jedni z pierwszych, oceną właściwości toksycznych, zajęli się badacze z firmy Dow Corning, która należy do światowych potentatów produkujących silikonu. Testowane na zwierzętach doświadczalnych ciekłe pochodne metylowe i metylofenylowe polisiloksanów po podaniu doustnym uznano za toksyczne w niewielkim stopniu. Jednak zauważono wówczas, że niskocząsteczkowy PDMS o strukturze liniowej i lepkości 0,65 cSt, o nazwie heksametylodisiloksan (HMDS), wywoływał łagodne oszołomienie i zaburzenia centralnego układu nerwowego, co wskazywało na zdolność absorpcji z przewodu pokarmowego [10,11]. Ponadto HMDS wywoływał stan zapalny i nekrozę w miejscach wstrzyknięć podskórnych, a po wstrzyknięciach dootrzewnowych wywoływał nawet efekt śmiertelny. W 1949 roku zarówno Rowe i Kern oraz w 1950 roku Barondes, prowadząc równoległe badania, stwierdzili przemijające podrażnienie spojówek wywołane przez polisiloksany po bezpośrednim podaniu do oczu [12-14]. W tym czasie wykazano także, że silikonu o większych ciężarach cząsteczkowych w postaci ciała stałego i żywic nie wywoływały objawów toksycznych.

Efekty uboczne nie były jednak powodem niepokoju toksykologów, ponieważ obserwowano je tylko w przypadku narażenia osób i zwierząt na wysokie dawki. Stąd też powszechnie uznano, że ciekłe polisiloksany są nieszkodliwe [10].

Firma Dow Corning miała jednak świadomość, że silikonu nie są obojętne dla organizmów żywych. W roku 1952 Cutting, prowadząc badania na zlecenie tej firmy, wykazał toksyczne działanie polidimetylosiloksanu DC 200 o lepkościach (50-12 500 cSt) podawanego zwierzętom doświadczalnym w pokarmie w stężeniu 1% w czasie od 3 do 4 miesięcy [11,15,16]. U prawie wszystkich badanych zwierząt wystąpiło uszkodzenie komórek nerkowych i zaobserwowano również kumulowanie się tych polimerów w śledzionie oraz zwiększenie ilości makrofagów. Firma Dow Corning podjęła decyzję o kontynuacji prac dotyczących oceny bezpieczeństwa stosowania silikonów i otworzyła Centrum Pomocy dla Badań Medycznych (Center for Aid to Medical Research), które dostarczało próbki dla chętnych niezależnych badaczy. Stało się to motorem do powstania i wszczęcia w 1962 roku pierwszego implantu piersi kobietom, które podane zostały mastektomii [11,17]. Jednakże oprócz zaleceń medycznych, wzrosło gwałtownie zainteresowanie implantami piersi z powodów estetycznych. Stąd też kontynuowanie badań nad ustaleniem wpływu tych polimerów na organizm wydawało się jeszcze bardziej istotne.

Najważniejszymi przykładami z około 400 doniesień naukowych dotyczących skutków oddziaływania polisiloksanów na organizm człowieka i zwierząt są: przenikanie niskocząsteczko-

wych polimerów przez bariery komórkowe do krwi, migracja i kumulowanie się wewnątrz organizmu w narządach, właściwości onkogenne, zmiana konformacji białek, wpływ na układ immunologiczny, genotoksyczność, podatność na biodegradację, drażnienie skóry i rozwój stanu zapalnego, powstawanie torbieli, wzrost ciśnienia śródgałkowego, działanie teratogenne [10-29]. Zebrane dane, będące wynikami badań przeprowadzonych w latach 1948–2011, odnoszą się do najczęściej wymienianych w piśmiennictwie objawów patologicznych, spowodowanych obecnością w warunkach *in vivo* polisiloksanów o budowie liniowej i cyklicznej.

Badania związane z wykazaniem oddziaływania polisiloksanów na organizm, według mojej opinii, można podzielić na dwa okresy. Pierwszy dotyczy kształtowania się poglądów od 1948 do około 1990 roku, drugi zaś od 1991 do chwili obecnej. Wyodrębnienie tych okresów nie jest związane ze zmianą koncepcji badań. W jednym i drugim przypadku badania dotyczyły podobnych obszarów, a zasady oceny bezpieczeństwa stosowania polisiloksanów także nie uległy większym zmianom. Wyodrębnienie tych dwóch okresów związane jest natomiast z rozwojem nauki w dziedzinie biologii molekularnej oraz postępem w dziedzinie technik i metod badawczych. Nowy warsztat analityczny coraz bardziej spełniał warunek specyficzności, co umożliwiało także prowadzenie analizy specjacyjnej. Dostępna zatem stawała się weryfikacja właściwości toksycznych polisiloksanu w zależności od jego rodzaju. Ponadto możliwe było prowadzenie analizy śladowej, dzięki uzyskiwaniu coraz niższej granicy oznaczalności stosowanej metody analitycznej. Postęp w nauce zwiększył zatem możliwość oceny toksykologicznej tej grupy polimerów.

Podsumowując należy podkreślić, że baza publikacyjna zawiera około 700, głównie eksperymentalnych, prac związanych z oceną toksykologiczną polisiloksanów, w tym PDMS. Jednakże w prezentowanych pracach przedstawiane opinie są niejednokrotnie sprzeczne. Szczególnie dotyczy to kwestii oddziaływania silikonów na układ immunologiczny, migracji wewnątrz organizmu, kumulacji, czy też wpływu kancerogennego. Z tego względu przyjęcie jednoznacznego stanowiska na temat toksyczności silikonów jest nie tylko trudne, ale aktualnie niemożliwe.

O istocie problemu świadczy także ciągle zainteresowanie Wspólnego Komitetu Ekspertów FAO/WHO, odnośnie ustalenia zakresu bezpieczeństwa stosowania polisiloksanów. Cyklicznie zlecane są badania toksykologiczne. W 2009 roku na sześćdziesiątych dziewiętych obradach zaprezentowano ostatni raport, w którym przedstawiono wyniki badań dla PDMS o strukturze liniowej i lepkościach 10 i 350 cSt [30]. Stwierdzono, że doustne podanie PDMS szczurom spowodowało uszkodzenie oczu, co wskazuje na zdolność absorpcji tych polimerów. Z tego powodu podjęto ponownie decyzję o powtórzeniu badań, ale najnowsze wyniki nie zostały jeszcze opublikowane. Temat toksyczności, bądź obojętności fizjologicznej jest zatem wciąż aktualny.

## Aktualny stan normatywny dotyczący doustnego stosowania PDMS

W produktach leczniczych i wyrobach medycznych, przeznaczonych do użytku wewnętrznego, dopuszczone są jedynie PDMS o strukturze liniowej. Jak już wspomniałam, takie PDMS różnią się pomiędzy sobą liczbą merów w cząsteczce, które determinują ich ciężar cząsteczkowy i lepkość. To właśnie wartość lepkości jest podstawą uregulowania zamieszczonego w monografiach farmakopealnych, odnośnie dopuszczalności ich stosowania [31-34]. W żadnej Farmakopei nie sprecyzowano jednak konkretnej lepkości PDMS, która może być stosowana w produkcji leków doustnych. Natomiast w Farmakopei Polskiej (FP) [31], Europejskiej (Ph.Eur.) [32] oraz Brytyjskiej (BP) [33] istnieją adnotacje, że PDMS o lepkości poniżej 50 cSt mogą być stosowane tylko w preparatach farmaceutycznych do użytku zewnętrznego.

Zdecydowanie bardziej szczegółowa jest norma dotycząca stosowania PDMS w produktach spożywczych. W 1979 roku Wspólny Komitet Ekspertów FAO/WHO do spraw Dodatków do Żywności (JECFA) na osiemnastych obradach ustalił Dopuszczalne Dienne Spożycie (ADI) dla PDMS w zakresie 0–1,5 mg/kg masy ciała. Natomiast w 1980 roku na dwudziestym trzecim spotkaniu Komitet Ekspertów JECFA dokonał uzupełnienia informacji, z której wynikało, że obowiązujące ADI dotyczy tylko PDMS o stopniu polimeryzacji  $n = 200\text{--}300$ , co odpowiada ciężarom cząsteczkowym w zakresie 15 000–22 000 Da. Decyzja ta została podjęta w obawie, że polimery o niższym ciężarze cząsteczkowym mogą być łatwo wchłaniane w organizmie. Jednak w 1990 roku dokonano kolejnych zmian specyfikacji, bez ponownego oceniania właściwości toksykologicznych. Na trzydziestym siódmym posiedzeniu Komitetu Ekspertów JECFA stwierdzono, że ADI można stosować dla PDMS o szerszym zakresie stopnia polimeryzacji, który wyniósł  $n = 90\text{--}410$ , co odpowiada ciężarom cząsteczkowym 6 800–30 000 Da i zakresie lepkości 100–1 500 cSt. Na posiedzeniu tym zaplanowano dalsze badania, które podzielono na dwa etapy:

- a) krótkoterminowe dla PDMS o lepkości 10 i 350 cSt;
- b) długoterminowe dla PDMS o lepkości 10 cSt.

Przygotowany na podstawie tych badań raport został przedstawiony w 2009 roku na sześćdziesiątych dziewiątych obradach JECFA. Wynika z niego, że podanie doustne PDMS przyczynia się do uszkodzenia oka szczurów i prawdopodobnie wchłaniania polimeru. Z tego powodu podjęto decyzję o zmniejszeniu wartości ADI z zakresu 0–1,5 mg/kg do 0–0,8 mg/kg masy ciała i zalecono powtórzenie badań toksykologicznych [30,35,36]. Wyniki nie zostały jeszcze opublikowane.

## Stosowanie PDMS w preparatach farmaceutycznych i dopuszczalne dawki

Farmacja to jeden z ważniejszych obszarów stosowania polidimetylosiloksanów. W lekach do użytku wewnętrznego spełniają rolę substancji leczniczej, substancji pomocniczej oraz matrycy w systemach terapeutycznych [37-39]. PDMS jako substancja czynna, występująca w różnych produktach leczniczych i wyrobach medycznych, w formie tabletek do żucia, kapsułek, granulatów, kropli, zawiesin, czy emulsji, nazywana jest Dimeticonum lub Simeticonum. Simeticonum to mieszanina Dimeticonum oraz 4–7 % ditlenku krzemu [31-34,37]. Polimery te wykazują działanie przeciwwzdęciowe, przeciwpienne oraz ochronne. Z tego powodu preparaty zawierające PDMS stosuje się przy wzdęciach, kolkach jelitowych, w przygotowaniu do diagnostyki oraz pomocniczo: w zespole jelita drażliwego, przy wrzodach żołądka, niewydolności trzustki, jak również zgagi [40]. Istotne jest to, że leki te są dyspensowane zarówno dorosłym, ale także dzieciom i niemowlętom, zwłaszcza w dolegliwościach wzdęciowych, spowodowanych kolkami jelitowymi. W Polsce dostępne są w sprzedaży odręcznej (OTC), z wyjątkiem Meteospasmylu. Do aktualnie dopuszczonych do obrotu na terenie Rzeczypospolitej Polskiej produktów leczniczych, zawierających w składzie Dimeticonum lub Simeticonum należą: Esputicon, Aero-OM, Bobotic, Espumisan, Gastrosil, Imodium Multi -Action, Infacol, Manti, Manti Gastop, Meteospasmyl, Simet, Ulgix Wzdęcia [41]. Od 2010 roku pojawiły się także preparaty zawierające Simeticonum: Espumisan Easy, Gastrokaps oraz Gaspertin, zarejestrowane, jako wyrób medyczny, a nie jak pozostałe – produkt leczniczy. Ponieważ są one zarejestrowane jako wyrób medyczny, nie figurują w urzędowym wykazie produktów leczniczych dopuszczonych do obrotu na terenie kraju i nie podlegają ścisłej kontroli według obowiązującego Prawa Farmaceutycznego. Można je szerzej reklamować, są także dostępne na rynku pozaaptecznym. Rejestracja tych produktów jako wyrobu medycznego jest prostsza i bezterminowa.

Ważną kwestią, niezbędną do oceny aspektów farmakologiczno–toksykologicznych związanych z PDMS, jest porównanie możliwości dziennego spożycia tych polimerów na podstawie:

- a) Dopuszczalnego Dziennego Spożycia – ADI (0–0,8 mg/kg masy ciała);
- b) minimalnych i maksymalnych dawek dobowych, zalecanych przez producentów;
- c) wykazu dawek w zakresie substancji czynnych wg FP VIII. Dawki dla Dimeticonum i Simeticonum, po raz pierwszy zawarte w FP VIII, przyjęte są dla mężczyzny w wieku 20–40 lat, o masie ciała ok. 70 kg.

Z porównania danych wynika, że w przypadku każdego produktu leczniczego i wyrobu medycznego nie zostały przekroczone minimalne i maksymalne dawki dobowe, zalecane przez producentów, w porównaniu z dawkami farmakopealnymi dla Dimeticonum i Simeticonum. Przy porównywaniu wartości należy jednak wziąć pod uwagę, że FP VIII prezentuje dawki, które zostały przyjęte dla mężczyzny w wieku 20–40 lat o masie ciała ok. 70 kg i nie można ich odnieść

do dzieci i niemowląt. Zdecydowanie w innym świetle prezentuje się porównanie dawek dla Dimeticonum i Simeticonum, zamieszczonych w wykazie wg FP VIII, oraz minimalnych i maksymalnych dawek dobowych, zalecanych przez producentów, z obowiązującą dawką ADI. Przykładowe porównanie danych wskazuje, że w przypadku stosowania kropli przez każdą grupę pacjentów, w porównaniu do ADI, nawet minimalne dawki dobowe zalecane przez producenta są przekroczone. W przypadku niemowląt 10 krotnie, dzieci do lat 6 – 2,5 krotnie, zaś dorosłych ok. 3 krotnie. Biorąc pod uwagę maksymalne dawki dobowe w przypadku niemowląt są one przekroczone 20 krotnie, dzieci do lat 6 – 5 krotnie, zaś dorosłych ponad 5 krotnie. Według FP VIII dla osoby dorosłej wielkość maksymalnej dawki dobowej przekroczona jest ponad 35 razy. Należy jednak nadmienić, że wielkość ADI stanowi podstawowe kryterium w ramach prac toksykologicznych, ale odnosi się do ilości substancji, która może być pobierana w ciągu całego życia nie powodując ryzyka zagrożenia zdrowia. ADI wyznacza się po zastosowaniu odpowiednich współczynników bezpieczeństwa, na podstawie tzw. najwyższego poziomu, przy którym nie obserwuje się efektów szkodliwych (No Observed Adverse Effect Level – NOAEL).

Jednak w kontekście przedstawionej problematyki, dotyczącej z jednej strony specyfiki chemicznej PDMS, z drugiej zaś niejednoznacznej opinii na temat ich oddziaływania na organizm, wydaje się zasadne stworzenie norm także dla obszaru zastosowań farmaceutycznych.

### **Prace badawcze poświęcone kontroli PDMS w preparatach farmaceutycznych**

Dotychczas niewiele uwagi poświęcono identyfikacji i oznaczaniu Dimeticonum lub Simeticonum w preparatach farmaceutycznych. W roku 1989 pojawiła się praca Anderssona i wsp., w której autorzy wykorzystali chromatografię wykluczania z detektorem refraktometrycznym do oznaczenia PDMS zawartego w emulsji [42]. Autorzy stwierdzili, że metoda spektroskopii IR, pomimo, że była wówczas najczęściej stosowaną metodą do oznaczania PDMS, a obecnie rekomendowaną przez Farmakopee, to w przypadku emulsji lub doustnych zawiesin okazała się nieodpowiednią. W pracy wykazano, że tło pochodzące od matrycy wpływa niekorzystnie na ocenę ilościową PDMS. Metodę spektroskopii w zakresie podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) wykorzystał w roku 1999 Torrado i wsp. do identyfikacji Dimeticonum w tabletkach i kapsułkach [43]. W przypadku ekstraktów z tabletek i kapsułek otrzymali widma podobne do widma wzorca PDMS, z wyjątkiem jednego preparatu. Przypadek ten, nie był jednak szczegółowo komentowany przez autorów. Na podstawie uzyskanych wyników uznano spektroskopię FTIR jako przydatną do oznaczania Dimeticonum w preparatach farmaceutycznych. W 2002 roku Moor i wsp. zastosowali metodę chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych z detektorem laserowo fotodispersyjnym (RP-HPLC-ELSD) [44]. Stwierdzili, że asymetryczny kształt piku PDMS może być związany z tym, że badany polimer nie jest indywidu-

um chemicznym, tylko mieszaniną oligomerów. W pracy nie określono jednak ani ciężaru cząsteczkowego, ani lepkości zidentyfikowanego analitu. Autorzy stwierdzili ponadto, że metoda przy zastosowaniu spektroskopii IR przedstawiona w Farmakopei nie jest satysfakcjonująca przy oznaczaniu PDMS w wieloskładnikowych preparatach farmaceutycznych. Konkretnie zwrócili uwagę na występowanie oddziaływań wodorotlenku magnezu i wodorotlenku glinu na PDMS. Przy oznaczaniu tego polimeru metodą IR wyniki były zmienne, przy czym przeważnie zawyżone. Natomiast w 2003 Jia i wsp. przeprowadzili analizę ilości śladowych PDMS w masie tabletkowej, który występował jako zanieczyszczenie pochodzące z silanizowanych części urządzeń. W badaniach zastosowali metodę atomowej spektrometrii emisyjnej ze wzbudzeniem w indukowanej plazmie (ICP-AES) [45]. Technika ta umożliwia jedynie oznaczanie krzemu sumarycznego, bez identyfikacji konkretnego związku krzemooorganicznego.

Pomimo, że autorzy stosowali różne metody i techniki analityczne jednak w żadnym przypadku nie przeprowadzono analizy specjacyjnej. Zaprezentowany warsztat analityczny nie spełnił także kryterium specyficzności.

## **Podsumowanie**

Uważam, że poruszone zagadnienia składają się na szerszy kontekst przedstawiający problematykę nie tylko bezpieczeństwa stosowania PDMS w świetle wcześniejszych, jak i aktualnych doniesień naukowych, ale także braku szczegółowych wyników badań tożsamości tego polimeru w preparatach farmaceutycznych. Przegląd piśmiennictwa, prezentowany także w moich publikacjach, wskazuje, że większość metod analitycznych nie jest specyficzna, a jedynie selektywna dla tego polimeru. Jednak mając na uwadze strukturę oraz wielkość cząsteczki, które wykazują wpływ na wchłanianie w organizmie, migrację oraz toksyczność, wydaje się niezbędne prowadzenie analizy specjacyjnej w oparciu o specyficzne metody. Ważne są badania i kontrola analityczna produktów leczniczych i wyrobów medycznych zawierających Simeticonum, jak i Dimeticonum, ponieważ stosują je nie tylko osoby dorosłe, ale podawane są także dzieciom i niemowlętom. Aktualny stan wiedzy na temat PDMS potwierdza, że konieczne jest poszukiwanie rozwiązań analitycznych, ze wskazaniem na specyficzność i jak najniższą granicę oznaczalności. Umożliwi to uzyskanie wielu niezbędnych informacji na temat obojętności biologicznej lub toksyczności polisiloksanów, z podziałem na rodzaj polimeru, drogę podania oraz dawkę wywołującą niepożądany efekt. Dzięki temu możliwa stanie się kwalifikacja ewentualnych grup narażenia, ze względu na szeroki obszar stosowania tych polimerów.

## **CEL BADAŃ**

W kontekście przedstawionej problematyki, mającej na uwadze specyfikę chemiczną poli-dimetylosiloksanów oraz, wynikającą z danych literaturowych, niejednoznaczną opinię na temat ich oddziaływania na organizm, dostrzegłam konieczność zastosowania analizy specjacyjnej tych polimerów.

Celem badań było opracowanie metody identyfikacji i oznaczania PDMS o strukturze liniowej w różnych postaciach produktów leczniczych i wyrobów medycznych przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym (SEC–ELSD).

Badania ukierunkowałam przede wszystkim na poszukiwanie metody analitycznej spełniającej kryterium specyficzności, które warunkuje przydatność w analizie specjacyjnej tych polimerów.

Głównym założeniem było, że opracowana metoda umożliwi identyfikację i oznaczanie PDMS różniących się stopniem polimeryzacji, a tym samym ciężarem cząsteczkowym i lepkością.

## **OMÓWIENIE WYNIKÓW**

Każda metoda analityczna przedstawia koncepcję uzyskiwania optymalnych informacji o obiekcie badań przy wykorzystaniu wybranej zasady pomiaru. Natomiast postępowanie analityczne przedstawia szerszy jej kontekst i obejmuje wszystkie etapy, od wybrania obiektu do przygotowania raportu. Celem moich badań było opracowanie metody identyfikacji i oznaczania PDMS o strukturze liniowej w różnych postaciach produktów leczniczych i wyrobów medycznych przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym, która spełnia kryterium specyficzności i warunkuje przydatność w analizie specjacyjnej tych polimerów.

### **Ocena specyficzności metody IR/FTIR rekomendowanej przez Farmakopee**

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Evaluation of the usefulness of the FTIR method recommended by the Pharmacopoeias in speciation analysis of polydimethylsiloxanes – manuskrypt w przygotowaniu

Zanim ukształtowała się zasadnicza koncepcja pracy badawczej dokonałam weryfikacji przydatności w analizie specjacyjnej PDMS metody spektroskopii w zakresie poczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR) rekomendowaną przez Farmakopee np.: FP, Ph.Eur., BP oraz Amerykańską (USP). Monografie farmakopealne dotyczące Dimeticonum i Simeiconum powstały w różnych latach w zależności od Farmakopei. Najwcześniejsza monografia, pochodząca z 1988 r. została przygotowana dla Dimeticonum i zamieszczona w BP, a następnie w 1995 r.

w USP 23, w której pojawiły się opisy zarówno dla Dimeticonum, jak i Simeconum wraz z propozycją stosowania metody IR lub FTIR do analizy. Ph.Eur. przygotowała monografię w 1997 r. dla Dimeticonum oraz, podobnie jak BP, w 2001 r. dla Simeconum. W przypadku FP monografie dotyczące tych polimerów ukazały się dopiero w roku 2008. W suplementie, wydanym w 2005 r. do FP VI z 2002 r., zamieszczono jedynie odesłanie do monografii dla Dimeticonum z Ph.Eur. 5.0 z roku 2005. Wszystkie Farmakopee wymagają, aby procedura identyfikacji Dimeticonum polegała na porównaniu otrzymanego widma IR lub FTIR z widmem porównawczego wzorca (Dimeticone CRS lub USP Polydimethylsiloxanes RS). Widmo wzorca Dimeticone CRS dostępne jest w katalogu widm, np. w BP. W przypadku Simeconum wymaga się potwierdzenia zgodności położenia maksimum absorpcji pięciu charakterystycznych pasm lub, tak jak w przypadku USP, porównania z widmem wzorca (USP Polydimethylsiloxanes RS).

Ze względu na specyfikę chemiczną PDMS, które mogą różnić się między sobą stopniem polimeryzacji, determinującym ciężar cząsteczkowy i lepkość, ważne było stwierdzenie, czy metoda IR lub FTIR, zalecana przez Farmakopee, jest przydatna w identyfikacji tych polimerów. Z punktu widzenia specyficzności metody i przydatności w analizie specjacyjnej istotna była weryfikacja, czy widma PDMS o różnych ciężarach cząsteczkowych będą wykazywały różnice. W ocenie ośmiu PDMS o lepkościach: 10, 50, 100, 350, 1 000, 5 000, 30 000 oraz 60 000 cSt, brałam pod uwagę ilość pasm, ich położenie oraz intensywność. Na podstawie uzyskanych rezultatów potwierdziłam zgodność liczby pasm charakterystycznych dla PDMS o lepkościach w zakresie 10–60 000 cSt oraz ich położenia. Zauważyłam jedynie nieznaczne różnice w intensywnościach pasm w zakresie liczb falowych  $1\,500\text{--}700\text{ cm}^{-1}$ . Na podstawie wstępnej oceny widm zaobserwowałam, że metoda FTIR charakteryzuje się niedostateczną specyficznością w analizie PDMS. Jednak wnioskowanie na temat specyficzności FTIR oraz przydatności w analizie specjacyjnej tego polimeru możliwe było dopiero w oparciu o wyniki obliczeń statystycznych. Do oceny statystycznej wybrałam wartości absorbancji pasm przy liczbach falowych: 2964, 1260, 1090, 1024,  $800\text{ cm}^{-1}$ . Wybór pasm związany był z ich odpowiednią intensywnością. Do oceny statystycznej posłużyły dane nie poddane procedurze standaryzacji, aby zwiększyć rozrzut wyników wokół wartości średniej. Standaryzacja widm uniemożliwiła zastosowanie testów statystycznych, ponieważ odchylenia standardowe, a tym samym wariancje, wykazywały zbyt małe wartości oraz nieznaczne różnice pomiędzy PDMS. Na podstawie testu analizy wariancji przy klasyfikacji pojedynczej (ANOVA) wraz z testem Hartleya stwierdziłam, że na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy o równości wartości średnich absorbancji wybranych pasm dla PDMS o lepkościach 10–60 000 cSt. Wyniki testu  $F_{oblicz}$  mieściły się w zakresie 1,0655–1,6673 i były mniejsze od wartości  $F_{tabel} = 2,0923$ . Natomiast warto-



ści prawdopodobieństwa  $p$  mieściły się w zakresie 0,2603–0,3093. Uznałam zatem, że różnice w intensywnościach pasm dla wybranych PDMS nie są statystycznie istotne.

Także przy porównywaniu widm Dimeticonum lub Simeticonum, zawartych w różnych postaciach wybranych produktów leczniczych i wyrobów medycznych, (kapsułkach Espumisanu, Esputiconu, Gaspertinu, GastroKaps i kroplach Esputiconu) nie zaobserwowałam różnic.

Ponadto istotnym problemem, który pojawił się w trakcie przeglądu opisu metody i procedury analitycznej w monografiach zawartych w Farmakopeach: FP, Ph.Eur. i BP, był brak szczegółowych propozycji identyfikacji Dimeticonum lub Simeticonum uwzględniających postać farmaceutyczną i złożony skład substancji pomocniczych. Z analitycznego punktu widzenia jest istotne, aby istniały indywidualne procedury przygotowania próbek. Zastosowanie proponowanej w monografiach farmakopealnych techniki filmu cieczy możliwe jest tylko w przypadku preparatu farmaceutycznego w postaci kropli nie zawierających substancji pomocniczych, bądź kapsułek, z których można pozyskać „czystą” substancję czynną. W przypadku innych postaci leku, np.: kropli z dodatkiem substancji smakowych, kapsułek żelatynowych, granulatów, zawieszin, emulsji, tabletek do żucia, przyjęto procedury zamieszczone w Farmakopei USP. Wynika z nich, że do ekstrakcji Simeticonum z kapsułek, emulsji, tabletek należy stosować toluen, zaś w przypadku zawiesiny doustnej, heksan. Przygotowanie ekstraktu zawierającego Dimeticonum lub Simeticonum, z określonej postaci farmaceutycznej, jest zasadne i konieczne, jednak proponowany przez USP 32–NF 27 toluen posiada charakterystyczne pasma w obszarach dla PDMS, których spektrometr FTIR nie może skompensować. Na podstawie przeprowadzonego badania wykazałam, że tylko jedno pasmo PDMS, przy liczbie falowej  $1260\text{ cm}^{-1}$ , nie nakłada się z pasmem od toluenu.

Stwierdziłam, że metoda FTIR nie spełnia kryterium przydatności w analizie specjacyjnej PDMS, w której można dokonać specjacji szczegółowej, czy indywidualnej tych polimerów. Z punktu widzenia kontroli leków i bezpieczeństwa ich stosowania ten rodzaj analizy specjacyjnej jest jednak istotny. Z uwagi, iż analiza specjacyjna wiąże się ściśle ze specyficznością metody, dlatego nie można w oparciu o FTIR stwierdzić jaki Dimeticonum lub Simeticonum występuje w konkretnym produkcie leczniczym, czy wyrobie medycznym. Ze względu na to, że położenie pasm drgań walencyjnych i deformacyjnych grupy  $\text{CH}_3$ ,  $\text{Si-CH}_3$  oraz  $\text{Si-O}$ , jest niezależne od stopnia polimeryzacji, a tym samym ciężaru cząsteczkowego i lepkości PDMS, zatem nie będzie możliwa weryfikacja, czy w danej doustnej postaci leku jest obecny PDMS posiadający lepkość poniżej 50 cSt. Według adnotacji zamieszczonej w FP VIII, Ph.Eur. 6.0 oraz BP 2007 w preparatach do użytku wewnętrznego nie można stosować takich PDMS. Powód zamieszczenia takiej informacji w monografiach farmakopealnych nie jest jednak komentowany. Prawdo-

podobnie jest to związane z doniesieniami na temat możliwości migracji, kumulowania się oraz niekorzystnego oddziaływania na organizm PDMS o mniejszych ciężarach cząsteczkowych.

Na tej podstawie wnioskuję, że metoda FTIR może mieć zastosowanie tylko w analizie specjacyjnej grupowej. Porównanie różnorodnych widm PDMS, pod względem liczby pasm i ich charakterystycznego położenia, pozwala zakwalifikować metodę FTIR jedynie do metod selektywnych dla PDMS.

## **Tworzenie koncepcji badań**

Biorąc pod uwagę zgromadzone dane na temat polisiloksanów oraz stwierdzenie braku przydatności metody spektroskopii w podczerwieni w analizie specjacyjnej PDMS, podjęłam decyzję o celu badań, będących podstawą prezentowanych osiągnięć.

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska, Jerzy Łukasiak: Problematyka związana z niektórymi kierunkami zastosowania polidimetylosiloksanów oraz możliwości analizy tych związków. *Polimery*, 2006, 51, 3, 186-191.

W publikacji zwróciłam uwagę na konieczność stosowania w przypadku polisiloksanów analizy specjacyjnej oraz zaprezentowałam własne opracowanie schematu analizy specjacyjnej związków krzemoorganicznych. Ponadto omówiłam dotychczasowy warsztat analityczny, stosowany w identyfikacji i analizie polisiloksanów, w tym PDMS. Zwróciłam także uwagę na ich budowę i właściwości, które ograniczają w sposób istotny możliwość opracowań nowych metod, ze względu na niewielką liczbę detektorów, które byłyby w stanie dokonać identyfikacji tych polimerów. Z tego powodu uzasadniłam wybór detektora laserowo fotodyspersyjnego (ELSD), który do tej pory, nie jest w Polsce rozpowszechniony.

Na przestrzeni prawie 30 lat analitycy coraz częściej wykorzystują detektor ELSD w badaniach różnorodnych związków chemicznych, który w powszechnej opinii zaliczany jest do typu detektorów uniwersalnych. Jest to związane ze specyfiką detekcji, polegającą na rozpraszaniu promieniowania lasera na nielotnych cząstkach analitu. Istnieje zatem jeden warunek, który powinien być spełniony, aby można wykorzystać ten detektor. Anality powinny charakteryzować się niewielką lotnością, a przynajmniej muszą wykazywać mniejszą lotność od fazy ruchomej. Zasada działania detektora oparta jest na pomiarze natężenia promieniowania rozproszonego na cząsteczkach aerozolu analitu. Eluat z kolumny chromatograficznej rozpylany jest w rozpylaczu za pomocą obojętnego gazu napędowego, np.: CO<sub>2</sub>, argonu, helu. Dzięki temu w podgrzewanej rurce dyfuzyjnej następuje sprawne odparowanie fazy ruchomej, zaś powstający zol nielotnego analitu zostaje przenoszony do celi pomiarowej, przez którą przechodzi promień np. lasera.

Na powstanie sygnału składają się trzy istotne procesy:

- a) rozpylenie (nebulizacja) eluatu;
- b) odparowanie fazy ruchomej i zagęszczenie składnika w cząstce aerozolu;
- c) rozpraszanie promieniowania monochromatycznego na tak wytworzonych cząstkach.

W badaniach równie ważne było dokonanie wyboru odpowiedniej techniki chromatograficznej. Kierując się fizycznymi i chemicznymi właściwościami uznałam, że w przypadku polimerów różniących się szerokim spektrum ciężarów cząsteczkowych chromatografia wykluczania umożliwi oczekiwane rozdzielanie. Podstawą rozdzielania cząsteczek analitu między fazę ruchomą i fazę nieruchomą są różnice w ich wielkości. W tym układzie faza ruchoma zabierając ze sobą składniki nastrzykniętej próbki, wprowadza je do fazy stacjonarnej, która charakteryzuje się porowatą budową, co z kolei decyduje o mechanizmie rozdzielania. Proces separacji w chromatografii wykluczania opiera się na zróżnicowanym opóźnieniu ruchu przepływających cząsteczek analitów różniących się promieniami hydrodynamicznymi, a w praktyce ciężarami cząsteczkowymi, co następuje wskutek przenikania ich na drodze dyfuzji do rozpuszczalnika zatrzymanego w porach fazy stacjonarnej. Cząsteczki, które są większe od wielkości porów (o największych promieniach hydrodynamicznych), nie będą przez nie dyfundowały, lecz przechodziły w przestrzeni poza nimi. Stan ten nazywany jest wykluczaniem. Całkowite wykluczanie zachodzi dla cząsteczek, które nie wchodzi w przestrzeń ani jednego pora. Proces ten następuje najszybciej w przypadku molekuł o największych ciężarach cząsteczkowych, co powoduje, że są one wymywane na początku procesu rozdzielania i są źródłem pierwszego piku na chromatogramie. Im mniejsza cząsteczka, tym większa jest ilość dostępnej dla niej objętości porów, przez co wydłuża się droga przechodzenia przez kolumnę. W przypadku, gdy molekuly są tak małe, że penetrują wszystkie pory fazy stacjonarnej, cała objętość fazy ruchomej staje się dla nich dostępna i następuje nieograniczona dyfuzja. Proces ten nazywa się całkowitym przenikaniem. Pomiedzy całkowitym wykluczaniem, a całkowitym przenikaniem znajduje się tzw. zakres roboczy, który jest charakterystyczny dla danej kolumny chromatograficznej i służy do wyznaczenia ciężarów cząsteczkowych analitów.

## Ocena przydatności detektora laserowo fotodyspersyjnego oraz techniki chromatografii wykluczania w analizie PDMS

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection: Method for determination of polydimethylsiloxanes.

I. Testing dependence of molecular weight of polydimethylsiloxanes and injected mass upon the detector signal. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, 1-6.

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection: Method for determination of polydimethylsiloxanes.

II. Application of TSK-GEL H<sub>HR</sub> GMH<sub>HR</sub>-M column to determine and separate molecular weight of linear polydimethylsiloxanes. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, 7-12.

Prezentowane publikacje po raz pierwszy pokazały możliwość zastosowania chromatografii wykluczania w połączeniu z detektorem laserowo fotodyspersyjnym w analizie specyficjnej PDMS o strukturze liniowej. W przypadku chromatografii wykluczania, przeciwnie, jak w pozostałych technikach chromatograficznych, wykorzystujących inne mechanizmy rozdzielania, np. podziałowy, adsorpcyjny, jonowymienny, wybór fazy stacjonarnej poprzedzony jest wyborem fazy ruchomej. Najpierw wybiera się optymalną fazę ruchomą, a następnie fazę stacjonarną, której wypełnienie nie będzie ulegało destrukcji pod wpływem niekorzystnego oddziaływania nieodpowiedniej fazy ruchomej. Z tego względu jedynym z kryteriów doboru fazy ruchomej w tej technice chromatograficznej jest odpowiednia zdolność rozpuszczania analitu. Planując zastosowanie detektora ELSD należało mieć jednak na względzie możliwość efektywnego odparowania proponowanej fazy ruchomej w warunkach działania detektora. Nieodpowiedni eluent może powodować znaczne szумы, niepowtarzalne wyniki lub niewielką intensywność sygnału, co tym samym zniweczy plan wykorzystania detektora. Badanie rozpuszczalności PDMS wykazało, że rozpuszcza się w chloroformie, tetrahydrofuranie, tetrachlorku węgla, toluenie, ketonie metyloizobutyłowym, natomiast nie rozpuszcza się np. w wodzie, alkoholach (metylowym, etylowym, izopropylowym) i acetonitrylu. Zatem przy wyborze optymalnej fazy ruchomej brałam pod uwagę zarówno temperatury wrzenia rozpuszczalników, które nie mogły ograniczać odparowania ich w rurce dyfuzyjnej przed detekcją analitu oraz obojętność chemiczną wobec wypełnienia fazy stacjonarnej. Faza stacjonarna natomiast musiała charakteryzować się odpowiednim zakresem roboczym dla ustalonego celu badań. Ostatecznie wybrałam chloroform, jako fazę ruchomą, oraz kolumnę TSK-GEL H<sub>HR</sub>GMH<sub>HR</sub>-M o wypełnieniu polistyren-diwinylbenzen, jako fazę stacjonarną.

Znaczną część badań poświęciłam poszukiwaniu optymalnego równania, opisującego zależność sygnału detektora ELSD od ciężaru cząsteczkowego PDMS o budowie liniowej i lepkości w zakresie 10–60 000 cSt oraz nastrzykniętej masy. Ocena monotoniczności funkcji odpowiedzi

detektora i określenie jej dla wybranych analitów dotyczyła przedziału mas 8,9–149,0  $\mu\text{g}$ . W celu wyznaczenia zależności wielkości sygnału detektora, wyrażonego jako pole powierzchni piku chromatograficznego, od masy analitu w  $\mu\text{g}$  dla poszczególnych PDMS, skorzystałam z kilku postaci funkcji oraz ich przekształceń. Obliczyłam parametry równań regresji dla funkcji prostoliniowej, potęgowej oraz kwadratowej, a także przekształceń tych funkcji w układzie logarytmicznym. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłam, że długość łańcucha (stopień polimeryzacji), lepkość, a tym samym ciężary cząsteczkowe wybranych PDMS nie mają wpływu na wielkość rozpraszania promienia lasera, a więc na intensywność sygnału. Brak istotnych różnic w przebiegach zależności intensywności sygnału ELSD od masy dla wybranych analitów potwierdziło otrzymywanie sygnału masowego. Wykazałam w tym przypadku możliwość sporządzania wspólnej krzywej kalibracji dla różnych PDMS zachowując ściśle określone warunki, tj.: prędkość przepływu fazy ruchomej, temperaturę rurki dyfuzyjnej, ciśnienie gazu nebulizującego. Z praktycznego punktu widzenia wniosek ten był bardzo istotny, ponieważ gwarantował rzetelne wyniki analizy ilościowej niezależnie od stopnia polimeryzacji PDMS oraz umożliwił uproszczenie procesu walidacji opracowywanej metody analitycznej. Stwierdziłam, że w zakresie badanych mas równanie regresji postaci funkcji prostoliniowej jest najbardziej optymalne do opisanie zależności sygnału detektora ELSD od masy PDMS o strukturze liniowej i lepkości w zakresie 10–60 000 cSt.

Badania wykazały także możliwość wykorzystania wzorców polistyrenu do kalibracji kolumny chromatograficznej w celu wykorzystania jej do wyznaczania ciężarów cząsteczkowych PDMS. Zostało to potwierdzone wyznaczeniem dokładności na podstawie wzorca PDMS o wartości deklarowanej ciężaru cząsteczkowego, wynoszącej 93 700 Da. Wykazałam szeroki zakres roboczy kolumny wynoszący od 376 do 2 570 000 Da, który był niezbędny do założonego celu badań.

## **Charakterystyka odpowiedzi detektora ELSD**

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size-exclusion chromatography with evaporative light scattering detection: Method for determination of polydimethylsiloxanes.

I. Testing dependence of molecular weight of polydimethylsiloxanes and injected mass upon the detector signal. *Journal of Chromatography B*, 2008, 865, 1-6.

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. On the Issue of Characteristic Evaporative Light Scattering Detector Response. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2009, 39, 89-94.

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

I: Influence of selected factors on the signal intensity of the detector.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53, 3, 503-509.

W trakcie badań powstał także dodatkowy nurt, związany z poznaniem specyfiki odpowiedzi detektora laserowo fotodispersyjnego. Temat wydawał się istotny z kilku powodów. Z danych piśmiennictwa wynikało, że w technikach chromatograficznych ten sposób detekcji jest coraz częściej wykorzystywany w różnorodnych analizach, w tym farmaceutycznych. Analizując wnioski zawarte w publikacjach, zauważyłam jednak brak jednolitej opinii na temat charakterystyki odpowiedzi detektora ELSD. Ponadto trudno było mi zaakceptować propozycje większości autorów odnośnie sposobu korzystania z detektora, które mogą utrudniać proces optymalizacji jego odpowiedzi lub wręcz przyczynić się do otrzymania fałszywych danych.

W prezentowanych publikacjach, będących częścią opisywanych osiągnięć, przedstawiłam problematykę związaną z odpowiedzią detektora ELSD wraz z własnym komentarzem i poglądami. Próbując przedstawić osobistą ocenę na tle piśmiennictwa, przytoczyłam tylko nieliczne przykłady, które uznałam za najważniejsze w tej dyskusji.

Po dogłębnej analizie danych z piśmiennictwa zauważyłam, że przewijają się tu dwa istotne aspekty. Pierwszy dotyczy traktowania przez większość autorów sygnału detektora jako sygnału masowego tzn., że odpowiedź detektora ELSD zależy tylko od masy analitu. Z tego powodu wielu analityków uważa, że detektor nie wymaga przygotowania do badań ilościowych indywidualnej krzywej kalibracji dla konkretnego analitu. Zaproponowano zatem korzystanie z „uniwersalnej” krzywej kalibracji, którą można przygotować wcześniej dla innego związku chemicznego. Istotne zatem było rozważenie, czy rzeczywiście możliwe jest korzystanie ze wspólnej krzywej wzorcowej niezależnie od rodzaju analitu. Drugi aspekt związany był z dyskusją na temat trudności w badaniach ilościowych i prawdopodobieństwa popełnienia błędów, które spowodowane były nieliniową odpowiedzią detektora.

Mając na uwadze wnioski, często sprzeczne, zaproponowane przez autorów różnych publikacji oraz własne wyniki doświadczeń sformułowałam pogląd, że dla konkretnej analizy należy przygotowywać odrębną krzywą kalibracji na podstawie wzorca analitu. Zwróciłam zatem uwagę, że nie można traktować tego detektora jako masowego, którego wielkość sygnału zależna jest jedynie od wprowadzonej masy, wyrażonej stężeniem analitu. Wspólna krzywa kalibracji mogłaby być wykorzystana w analizie mieszaniny różnych związków, ale tylko wówczas, gdy przeprowadzi się wcześniejsze doświadczenia, których rezultaty do tego uprawniają. Zauważyłam, że pomimo prostej zasady pomiarowej, polegającej na rozproszeniu wiązki lasera na nielotnych cząstkach analitu, mechanizm tworzenia sygnału jest bardzo skomplikowany. Opiera się on na teorii rozpraszania promieniowania elektromagnetycznego, w której można wyróżnić pięć głównych zjawisk wpływających na rozpraszanie w detektorze ELSD. Należą do nich: rozpraszanie Rayleigha, rozpraszanie Mie, rozpraszanie geometryczne, odbicie oraz refrakcja. Które zjawisko występuje samodzielnie lub w przeważającej większości zależne jest od wielu czynników.

Łącząc teorie i zjawiska rozpraszania z różnymi rozwiązaniami technicznymi detektora zaproponowałam podział tych czynników na cztery grupy:

- a) pierwsza – parametry, które określają jakość rozdzielania i dlatego nie mogą być dowolnie zmieniane; należą tu: prędkość przepływu i skład fazy ruchomej, objętość nastroju i stężenie próbki;
- b) druga – parametry, które mogą być ustalone przez analityka; należą tu: ciśnienie gazu nebulizującego, temperatura rurki dyfuzyjnej i celi pomiarowej oraz wzmocnienie fotopowielacza;
- c) trzecia – związana z właściwościami fizycznymi i chemicznymi samego analitu np. stan skupienia, kształt cząsteczki, wielkość cząsteczki, masa lub ciężar cząsteczkowy, stopień nienasyceń, lotność, gęstość, lepkość, napięcie powierzchniowe, współczynnik załamania światła;
- d) czwarta – związana z rodzajem zastosowanego gazu nebulizującego np. ditlenku węgla, azotu, helu, czy powietrza i w jakimś stopniu prawdopodobnym wpływem ich przewodnictwa cieplnego na wielkość sygnału.

Można wyrazić pogląd, że zrozumienie mechanizmu powstawania sygnału w detektorze ELSD jest przydatne w modulowaniu intensywności sygnału. Wykorzystanie występujących zależności pomiędzy parametrami pozwoli optymalizować warunki oznaczenia, których celem jest otrzymanie jak największej intensywności sygnału detektora, przy jak najmniejszym powstawaniu szumów. Jest to szczególnie istotne w badaniach ilościowych, zwłaszcza, gdy dotyczą analizy śladowej. Ponadto znajomość tego mechanizmu powinna stać się przyczynkiem do weryfikacji hipotezy o traktowaniu detektora ELSD jako detektora wyłącznie masowego oraz możliwości korzystania z uniwersalnej krzywej kalibracji, co miało na celu upraszczanie analiz. Intensywność sygnału zależy bowiem nie tylko od wprowadzonej masy analitu, ale także od innych czynników. Próba wyjaśnienia mechanizmu powstawania sygnału w detektorze ELSD jest przedmiotem aktualnie przygotowywanego manuskryptu:

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. On the Issue of mechanism of create signal of the Evaporative Light Scattering Detector. – manuskrypt w przygotowaniu do Critical Reviews in Analytical Chemistry

Ze względu na brak w piśmiennictwie szczegółowego opisu mechanizmu powstawania sygnału w detektorze ELSD oraz znaczne nim zainteresowanie podjęłam próbę przeanalizowania: teorii rozpraszania, zjawisk wpływających na intensywność rozpraszania oraz wzajemnej zależności parametrów istotnych w tym procesie.

Biorąc pod uwagę problem dotyczący braku liniowości odpowiedzi detektora uznałam, że nie stanowi to przeszkody w jego wykorzystaniu do badań ilościowych. Istnieje bowiem moż-

liwość linearyzacji zależności sygnału od masy analitu przy pomocy prostych przekształceń dokonywanych na zmiennych. Ważne jest jednak to, aby funkcja tej zależności była monotoniczna i ściśle zdefiniowana, tzn. opisana takim równaniem, gdzie współczynnik determinacji byłby bliski 1. Ponadto zauważyłam, że dla różnorodnych związków chemicznych otrzymywano zależności opisywane różnymi równaniami matematycznymi, w tym także równaniem prostoliniowym. Tak więc brak liniowości nie tylko nie wyklucza przydatności detektora ELSD w technikach chromatograficznych, ale również nie utrudnia analiz. Można uznać, że w przypadku detektora laserowo fotodispersyjnego nieliniowy charakter odpowiedzi jest także konsekwencją skomplikowanego mechanizmu powstawania sygnału.

### **Optymalizacja metody oznaczania PDMS przy wykorzystaniu SEC-ELSD**

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

I: Influence of selected factors on the signal intensity of the detector.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 53, 3, 503-509.

Zdobyta wiedza dotycząca charakterystyki odpowiedzi detektora stała się inspiracją moich kolejnych etapów badań. W publikacji przedstawiłam wyniki oceny wpływu ciśnienia gazu nebulizującego (nośnego), temperatury rurki dyfuzyjnej i celi pomiarowej oraz prędkości przepływu fazy ruchomej na wielkość sygnału, poziom szumów oraz powtarzalność wyników. Wybrane czynniki okazały się kluczowe w tworzeniu się sygnału ELSD i niezbędne w optymalizacji parametrów metody oznaczania PDMS. Wykazałam ich wpływ na procesy: rozpylenia (nebulizacji), odparowania fazy ruchomej i rozproszenia wiązki fali elektromagnetycznej, od których zależy powstanie sygnału detektora.

Prędkość przepływu gazu nośnego CO<sub>2</sub>, a tym samym jego ciśnienie, wykazało bezpośredni wpływ na ważny proces powstawania sygnału, którym jest nebulizacja eluatu, czyli rozpylenie do postaci subtelnego aerozolu. Podczas tego procesu otrzymuje się jednolite krople o określonej wielkości. Prędkość przepływu gazu nebulizującego może być regulowana, a jej zakres uzależniony jest od typu detektora. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłam istnienie zależności intensywności sygnału ELSD (wyrażonej jako pole powierzchni pików) od ciśnienia gazu. Im większe ciśnienie CO<sub>2</sub>, tym pole powierzchni pików było mniejsze, a więc mniejsza intensywność sygnału. Większe ciśnienie powodowało powstanie mniejszych rozmiarów kropli aerozolu, na których następowało mniejsze rozproszenie wiązki lasera.

Jak już wcześniej wspominałam istotnym etapem detekcji było odparowanie fazy ruchomej, w wyniku czego powstają „suche” cząstki analitu zdolne do rozpraszania. Skuteczne odparowa-



nie fazy ruchomej odbywa się dzięki nebulizacji eluatu oraz odpowiedniej temperatury. Stąd też ważnym parametrem był wybór odpowiedniej temperatury rurki dyfuzyjnej i celi pomiarowej. Optymalna temperatura musiała być tak dobrana, aby z jednej strony nie spowodować lotności analitu, z drugiej zaś umożliwić odparowanie fazy ruchomej przed detekcją. Podwyższenie temperatury rurki dyfuzyjnej i celi pomiarowej jest niezbędne w przypadku zwiększenia prędkości przepływu eluatu przez nebulizator. Jednak nadmierna temperatura może spowodować wrzenie fazy ruchomej, co skutkuje wzrostem poziomu szumów. Ponadto zbyt wysoka temperatura może również niekorzystnie wpływać na sam analit, poprzez spowodowanie jego lotności lub wręcz rozkładu. Z tych względów przy doborze temperatury odparowania brałam pod uwagę właściwości fizyczne analitu i fazy ruchomej.

W badaniach wykazałam także wpływ prędkości przepływu fazy ruchomej na intensywność sygnału, powtarzalność wyników i zwiększenie szumów. Przy większej prędkości obserwowałam mniejszą intensywność sygnału. W tym przypadku stwierdziłam, że powodem tego był spadek wydajności nebulizacji, podczas której faza ruchoma nie zdążyła odparować.

W trakcie optymalizacji warunków pomiarowych brałam pod uwagę nie tylko najkorzystniejszy efekt działania danego parametru na konkretny proces, ale przede wszystkim na wzajemne relacje. Przy wyborze odpowiednich parametrów posługiwałam się wnioskowaniem statystycznym. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdziłam, że można wybrać wspólne warunki pomiarowe dla PDMS różniących się ciężarem cząsteczkowym i lepkością. Rezultat ten był niezwykle istotny w planowaniu dalszych etapów badań związanych z walidacją metody, jak również z wykorzystaniem jej w badaniach preparatów farmaceutycznych.

## **Wyznaczenie parametrów walidacji opracowanej metody oznaczania PDMS przy wykorzystaniu SEC-ELSD**

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska: Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

II. Validation of the method for analysis of pharmaceutical formulations.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, 56, 4, 851-858.

Jednym z ważniejszych etapów opracowania metody analitycznej jest przeprowadzenie procesu walidacji. Dzięki niemu można zdefiniować daną metodę. Sens i cel walidacji dotyczy jednak wielu aspektów i w zależności od dziedziny może być różny. W przypadku metod analitycznych, wykorzystywanych w kontroli produktów leczniczych, cel walidacji jest jasno sprecyzowany. Metody muszą gwarantować ich bezpieczeństwo, skuteczność oraz należytą jakość. Tak więc niezbędna jest identyfikacja substancji leczniczej, dopuszczonej do stosowania w lecz-

nictwie, jak również badanie ilościowe, pozwalające ustalić jej zawartość w konkretnym preparacie farmaceutycznym oraz oznaczenie dopuszczalnych zawartości zanieczyszczeń.

Manuskrypt przedstawia rezultaty przeprowadzonego procesu walidacji prezentowanej metody oznaczania PDMS w preparatach farmaceutycznych przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym. Przy wyborze parametrów walidacyjnych, charakteryzujących metodę, kierowałam się wytycznymi, zawartymi w aktualnych dokumentach i raportach: Farmakopei europejskiej i amerykańskiej, Międzynarodowej Konferencji ds. Harmonizacji wymogów technicznych do rejestracji farmaceutyków przeznaczonych dla ludzi (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – ICH) [46], Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) [47], a także Amerykańskiej Organizacji ds. Żywności i Leków (US Food and Drug Administration – FDA) [48]. W pracy skomentowałam brak jednolitego podejścia w metodologii walidacji. Choć zasadniczo strategia podejścia do procesu walidacji metod stosowanych w kontroli jakości leków jest podobna, to jednak istnieją niewielkie rozbieżności. Z tego względu w przeprowadzaniu procesu walidacji opierałam się nie tylko na tych wytycznych, ale także podjęłam decyzję o poszerzeniu zakresu wyznaczanych parametrów. Uznałam, że postęp wiedzy w zakresie bezpieczeństwa stosowania PDMS wymaga do ich oceny metod analitycznych, wyróżniających się szczególnie specyficnością. Bez względu na dziedzinę, do której należy np.: farmacja, medycyna, przemysł spożywczy, chemia, czy też ochrona środowiska, celem walidacji jest ustalenie, czy proponowana metoda analityczna jest odpowiednia dla konkretnego zamierzenia. Jest to możliwe wówczas, gdy wyznaczone wartości parametrów walidacji porówna się z wartościami przyjętych kryteriów akceptacji, które są różne w zależności od obszarów i celów badawczych. Dopiero ten etap umożliwia uzyskanie wartości merytorycznej dla konkretnego parametru walidacji, która staje się gwarancją, że wynik analizy jest rzetelny i wiarygodny.

Próbki do badań stanowiły wzorce PDMS o zróżnicowanych ciężarach cząsteczkowych oraz produkt leczniczy o skomplikowanej matrycy, którą tworzyły substancje pomocnicze. Osiągnięte rezultaty wraz z przyjętymi kryteriami akceptacji (tabele 12 i 13 w publikacji) wykazały przydatność opracowanej metody w oparciu o chromatografię wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym do identyfikacji oraz badań ilościowych PDMS obecnych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych.

## Wykorzystanie opracowanej metody w analizie Dimeticionum oraz Simeticionum obecnych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych

Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska. Size exclusion chromatography with evaporative light scattering detection as a method for speciation analysis of polydimethylsiloxanes.

III. Identification and determination dimeticone and simeticone in pharmaceutical formulation.

*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.09.003

Opracowaną metodę wykorzystałam do identyfikacji oraz badania zawartości Dimeticionum lub Simeticionum w różnych postaciach farmaceutycznych wybranych produktów leczniczych i wyrobów medycznych przeznaczonych do użytku wewnętrznego, takich jak: tabletki do żucia, kapsułki, granulaty, krople, zawiesina oraz emulsja. Wybrane produkty lecznicze i wyroby medyczne różniły się między sobą nie tylko postacią farmaceutyczną, ale także rodzajem substancji pomocniczych (matrycą), datą ważności oraz zawartością PDMS. Dlatego celem tych badań była nie tylko identyfikacja i badanie ilościowe, ale także porównanie tożsamości Dimeticionum, czy Simeticionum użytego przez różnych producentów, wpływ matrycy na wynik analizy, wpływ upływu daty ważności na zmiany zachodzące w tym polimerze oraz ocena konieczności dodatku kwasu chlorowodorowego, jako istotnego etapu przygotowania próbek.

Procedury przygotowania próbek do analizy były tylko częściowo oparte na monografiach zawartych w Farmakopeach [31-34], ponieważ nie zawierają one szczegółowych opisów analizy substancji czynnej w konkretnych postaciach leku. Jedynie w USP zamieszczone są monografie opisujące postępowanie w przygotowaniu tabletek, kapsulek, zawiesin i emulsji [34]. Porównując jednak wszystkie monografie zamieszczone w tych Farmakopeach dostrzegłam wspólną strategię analizy Dimeticionum lub Simeticionum, która polegała na ujednoczeniu ogólnych etapów procedury analitycznej.

Identyfikację polimeru przeprowadziłam na podstawie uzyskanych czasów retencji i ciężarów cząsteczkowych. Do wyznaczenia ciężarów cząsteczkowych korzystałam z krzywej kalibracji kolumny TSK-GEL H<sub>HR</sub>GMH<sub>HR</sub>-M przy wykorzystaniu niskodispersyjnych certyfikowanych wzorców polistyrenu o ciężarach cząsteczkowych w zakresie 376–2 570 000 Da. Krzywą kalibracji stanowiła wyznaczona zależność pomiędzy logarytmem z wartości ciężaru cząsteczkowego ( $\log M_p$ ) i czasem retencji ( $t_r$ ). Badania ilościowe prowadziłam na podstawie pomiarów pola powierzchni pików. Zawartość Dimeticionum obliczałam na podstawie równania regresji prostoliniowej, wyrażającej zależność pola powierzchni pików od stężenia przy wykorzystaniu wzorca PDMS o lepkości 350 cSt. W przypadku oznaczania zawartości Simeticionum korzystałam z równania regresji prostoliniowej otrzymanej na podstawie wzorca Simeticone USP o deklarowanej przez producenta lepkości Dimeticionum 440 cSt.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że substancja czynna w wybranych produktach leczniczych i wyrobach medycznych, z wyjątkiem jednego leku, charakteryzowała się

ciężarem cząsteczkowym w zakresie 9 124–15 617 Da, co odpowiada lepkości ok. 140–440 cSt. We wszystkich przypadkach, oprócz preparatu Espumisan w postaci emulsji dawkowanej w kroplach, Dimeticonum lub Simeticonum jest zgodny z danymi zawartymi w Farmakopeach jako substancja czynna dopuszczona w lekach do użytku wewnętrznego. W preparacie Espumisan zidentyfikowałam polimer o niedozwolonym ciężarze cząsteczkowym. Pojawił się dodatkowy pik o czasie retencji 9,35 min, który odpowiadał wartości ciężaru cząsteczkowego 813 Da. Interpretując otrzymany rezultat rozważałam dwie możliwości:

1. podczas ekstrakcji substancji czynnej: ( $t_r = 7,91$  min, ciężar cząsteczkowy 12 889 Da) nastąpiła także ekstrakcja substancji pomocniczej: ( $t_r = 9,35$  min, ciężar cząsteczkowy 813 Da), albo
2. substancja czynna (Simeticonum) jest mieszaniną polimerów o różnych ciężarach cząsteczkowych, a zatem lepkości.

Na podstawie uzyskanych danych stwierdziłam, że nie jest możliwa ekstrakcja substancji pomocniczych, do których należały: kwas sorbowy, cyklamian sodu, sacharynian sodu oraz hydroksypropyloceluloza ze względu na brak ich rozpuszczalności w chloroformie. Natomiast w przypadku aromatu bananowego, który jest estrem alkoholu izoamyłowego z kwasem octowym, związek ten rozpuszcza się w chloroformie, ale jego masa cząsteczkowa nie odpowiada zidentyfikowanej wartości. Uzyskane wyniki wskazują, że użyte przez producenta Simeticonum jest mieszaniną polimerów, a dodatkowa frakcja PDMS, o zbyt niskim ciężarze cząsteczkowym, jest niezgodna z zaleceniami FP, Ph.Eur i BP.

Przeprowadzone badania wykazały zróżnicowanie pod względem stopnia polimeryzacji PDMS stosowanego przez różnych producentów. Ponadto stwierdziłam brak wpływu matrycy, którą stanowiły substancje pomocnicze, na specyficzność proponowanej metody analitycznej, proces ekstrakcji i odzysk substancji czynnej z różnorodnych postaci farmaceutycznych. Podczas badań nie zaobserwowałam także znaczących różnic w chromatogramach produktów leczniczych o aktualnym terminie ważności i przekroczonym nawet o kilka lat. Opracowana metoda może zatem służyć do oceny trwałości i podatności na degradację cząsteczki tego polimeru. Ważnym etapem badań było oznaczanie zawartości Dimeticonum lub Simeticonum w wybranych produktach leczniczych i wyrobach medycznych i porównanie z wartością deklarowaną przez producenta. Dane wskazują, że zawartość substancji czynnej kształtowała się w zakresie 95,17 – 113,8 % w stosunku do wartości deklarowanych. Analiza ilościowa pozwoliła także zrealizować jeden z celów badań, którym była ocena wpływu dodatku kwasu chlorowodorowego na poprawność przyjętej procedury przygotowania próbki. Wykazałam, że w przypadku braku dodatku kwasu oznaczona zawartość PDMS była około 2,5 razy niższa w stosunku do zawartości uzyskanej przy ekstrakcji tego preparatu w środowisku kwaśnym. Przyczyną tego może być złożoność matrycy, która może powodować adsorpcję substancji czynnej w masie substancji

pomocniczych i utrudniać ekstrakcję. Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdziłam, że dodatek rozcieńczonego kwasu chlorowodorowego w stosunku 2:3 jest niezbędnym etapem w przygotowaniu próbek do analizy.

## WNIOSKI

Przedmiotem badań było opracowanie metody oznaczania PDMS o strukturze liniowej w różnych postaciach farmaceutycznych produktów leczniczych i wyrobów medycznych przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym.

Przeprowadzone badania wykazały, że metoda SEC–ELSD wyróżnia się specyficnością, w stosunku do farmakopealnej metody IR. Umożliwia to identyfikację PDMS na podstawie wyznaczonych ciężarów cząsteczkowych. Kryterium specyficności dla metody analitycznej zakłada możliwość rozróżniania analitów w mieszaninie i identyfikacji konkretnego indywiduum chemicznego. Ponadto wykorzystana w badaniach specyfika mechanizmu chromatografii wykluczania może przyczynić się do rozwoju analizy specjacyjnej PDMS w innych matrycach, po zoptymalizowaniu etapu przygotowania próbki o konkretnym składzie.

Osiągnięte rezultaty wraz z przyjętymi kryteriami akceptacji wykazały przydatność opracowanej metody nie tylko do identyfikacji, ale także badań ilościowych PDMS, stosowanego jako Dimeticonum lub Simeticonum w produktach leczniczych i wyrobach medycznych.

Opracowana metoda może posiadać walory aplikacyjne zarówno jako metoda alternatywna dla rekomendowanej przez Farmakopeę metody spektroskopii w zakresie podczerwieni, jak też jej uzupełnienie. Na podstawie chromatografii wykluczania w połączeniu z detektorem laserowo-fotodyspersyjnym możliwa jest identyfikacja oraz badania ilościowe PDMS obecnych w preparatach farmaceutycznych, a uzyskane wyniki są rzetelne i wiarygodne.

Należy także zwrócić uwagę na fakt, że w Farmakopeach podstawą normy dopuszczenia do stosowania PDMS w preparatach farmaceutycznych jest lepkość. Jednak parametr ten wydaje się niewystarczający, aby stał się kryterium w kontroli leków. Pożądana lepkość PDMS, warunkująca fizyczną cechę danego analitu, może być uzyskana nie tylko w wyniku syntezy chemicznej, ale również w wyniku zmieszania PDMS o różnych lepkościach (a więc i ciężarach cząsteczkowych), korzystając z diagramów mieszania podawanych niekiedy w prospektach różnych firm. Zdecydowanie uważam, że parametrem rekomendowanym powinien być ciężar cząsteczkowy, który można wyznaczyć np. na podstawie metody SEC–ELSD.

Należy także podkreślić, że opracowana metoda nie była dotąd stosowana w kontroli preparatów farmaceutycznych zawierających ten polimer, jak również nie napotkałam na publikację, w której zaprezentowano by wykorzystanie jej w analizie PDMS, lecz w innych matrycach. Nie odnotowałam także prac, które poświęcono by analizie specyficzynej PDMS zawartych w lekach. Mając to na uwadze, wyrażam pogląd, że prezentowana metoda zawiera cechę innowacyjności w kontroli analitycznej PDMS stosowanych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych.

Konieczność poszukiwania nowych metod analitycznych powinno być związane nie tylko z doniesieniami na temat działania toksycznego danego analitu, ale przede wszystkim powinno służyć wiarygodności rutynowych kontroli. Istnieje bowiem możliwość, że w produktach leczniczych i wyrobach medycznych, które stosują nie tylko osoby dorosłe, ale także dzieci i niemowlęta, mogą pojawić się PDMS o strukturze liniowej o niepożądanym stopniu polimeryzacji.

Istotę poruszanego problemu warto odnieść także do proponowanej wg FP VIII maksymalnej dawki dobowej dla Dimeticonum, wynoszącą 2 g, a przyjętą dla mężczyzny o masie ciała ok. 70 kg oraz dawek obliczonych w miligramach na kilogram masy ciała, które spowodowały uśmiercenie 50% badanej populacji szczurów po podaniu doustnym PDMS o różnych ciężarach cząsteczkach, a tym samym lepkości (*dosis letalis LD<sub>50</sub>*). Dla PDMS o lepkości 10 cSt dane LD<sub>50</sub> nie są znane (data uaktualnienia 2010), dla PDMS o lepkości 50 cSt LD<sub>50</sub> wynosi > 50 [mg/kg] (data uaktualnienia danych 2011), dla PDMS o lepkości 350 cSt LD<sub>50</sub> wynosi > 2 000 [mg/kg] (data uaktualnienia danych 2009), zaś dla PDMS o lepkości 60 000 cSt LD<sub>50</sub> wynosi > 5 000 [mg/kg] (data uaktualnienia danych 2010) [49-52]. Na podstawie porównania tych danych wynika, że dawka dobowo dla mężczyzny w wieku 20–40 lat, o masie ciała ok. 70 kg, wynosi 30 mg/kg i zbliżona jest do LD<sub>50</sub> dla PDMS średnicząsteczkowego o lepkości 50 cSt. W przypadku niskocząsteczkowego PDMS (lepkość 10 cSt) dawka LD<sub>50</sub>, choć w momencie powstawania niniejszego opracowania nie była jeszcze podana do publicznej wiadomości, będzie z pewnością znacznie niższa. Obniżanie wartości LD<sub>50</sub> w zależności od lepkości PDMS związane jest prawdopodobnie, jak donoszą wyniki badań, z możliwością penetracji tych polimerów wewnątrz organizmu.

Podsumowując:

1. Dla celów analizy specyficzynej PDMS stosowanych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych opracowałam, nie opisaną dotychczas w piśmiennictwie, metodę analityczną przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym.

2. Wykazałam, że opracowana metoda identyfikacji i oznaczania PDMS o strukturze liniowej w różnych postaciach produktów leczniczych i wyrobów medycznych, przy wykorzystaniu SEC–ELSD, wyróżnia się specyficznością, w stosunku do rekomendowanej farmakopealnej metody IR. Stąd też może posiadać walory aplikacyjne, jako metoda alternatywna, dla rekomendowanej przez Farmakopee metody spektroskopii w zakresie podczerwieni, lub jako jej uzupełnienie.
3. Wykazałam, że opracowana metoda analityczna umożliwia identyfikację i oznaczanie PDMS różniących się stopniem polimeryzacji, a tym samym ciężarem cząsteczkowym i lepkością.
4. Wykazałam, że opracowana metoda wraz z przyjętymi kryteriami akceptacji jest przydatna w kontroli produktów leczniczych i wyrobów medycznych, zawierających Simeticonum i Dimeticonum.
5. Na podstawie uzyskanych wyników uważam, że zaprezentowana metoda wykazuje cechy innowacyjności w problematyce kontroli analitycznej polidimetylosiloksanów stosowanych w produktach leczniczych i wyrobach medycznych.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Florjańczyk Z., Penczek S. (red.). *Chemia polimerów*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa, 2002. ISBN 83-7207-265-5.
- [2] Brook M. A. *Silicon in Organic, Organometallic and Polymer Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, England, 2000. ISBN 0471196584, 9780471196587.
- [3] Mojsiewicz-Pieńkowska K., Łukasiak J. Polidimetylosiloksany w środowisku człowieka. *Polimery*, 2003, 48, 6, 403-409.
- [4] Rabek J. F. *Współczesna wiedza o polimerach*, PWN, Warszawa, 2008. ISBN 978-83-01-15569-8.
- [5] Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K. *Handbook of Elemental Speciation. Techniques and Methodology*. John Willey&Sons Ltd., Chichester, England, 2003. ISBN 978-0-471-49214-6.
- [6] Barańkiewicz D., Bulska E. (red.). *Specjacja chemiczna. Problemy i możliwości*, Wydawnictwo Malamut, Warszawa, 2009. ISBN 978-83-925269-5-7.
- [7] Templeton D. M., Ariese F., Cornelis R., Danielsson L. G., Muntau H., von Leeuwen H. P., Lobiński R. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionating of elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000), *Pure App. Chem.*, 2000, 72, 8, 1453-1470.
- [8] Namieśnik J. Trendy w analityce i monitoringu środowiska, w: *Nowe Horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*, red. J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek. Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk, 2003. ISBN 83-919081-1-9.
- [9] Cornelis R., Caruso J., Crews H., Heumann K. *Handbook of Elemental Speciation II. Species in the Environment, Food, Medicine and Occupational Health*. John Willey&Sons Ltd., Chichester, England, 2005. ISBN 978-1-61583-269-9.
- [10] Bondurant S., Ernster V., Herdman R. *Safety of Silicone Breast Implants*, The National Academy of Sciences, Washington, 2000. ISBN 0-309-06632-1.
- [11] <http://repo-nt.tcc.virginia.edu/book2/chapter4sec7.htm>

- [12] Rowe V. K., Spencer H. C., Bass S. L. Toxicological studies on certain commercial silicones and hydrolyzable silane intermediates, *J. Ind. Hygiene Toxicol.*, 1948, 30, 6, 332-352.
- [13] Barondes R., Judge W. D., Towne C. G., Baxter M. L. New organic derivatives and some of their unique properties, *The Military Surgeon.*, 1950, 379-386.
- [14] Kern S. F., Anderson R. C., Harris P. N. Observations on the toxicity of methyl-silicone, *J. Am. Pharm. Assoc.*, 1949, 38, 10, 575-576.
- [15] Cutting W. C. Toxicity of silicones, *Stanford Med. Bull.*, 1952, 10, 1, 23-26.
- [16] Shanklin D. R., Smalley D. L. The Immunopathology of Siliconosis, *Immunol. Res.*, 1998, 18, 3, 125-173.
- [17] Ericsson D. Syndromes Associated with Silicone Breast Implants: A Clinical Study and Review, *J. Nutr. Environ. Med.*, 1998, 8, 35-51.
- [18] Kossovsky N., Gornbein J. A., Zeidler M., Stassi J., Chun G., Papasian N., Nguyen R., Ly K., Rajguru S. Self-Reported Signs and Symptoms in Breast Implant Patients with Novel Antibodies to Silicone Surface Associated Antigens [anti-SSAA(x)], *J. Appl. Biomat.*, 1995, 6, 153-160.
- [19] Gorczyca D. P. *The Augmented breast, Radiologic and Clinical Perspectives*, Thieme, New York, 1997. ISBN 0-86577-612-1.
- [20] Shanklin D. R., Smalley D.L. Kinetics of T lymphocyte responses to persistent antigens. *Exp. Mol. Pathol.*, 2006, 80, 1, 26-37.
- [21] Backovic A., Wolfram D. Silicone mammary implants—can we turn back the time? *Exp. Gerontol.*, 2007, 42, 713-718.
- [22] Pfeleiderer B., Garrido L. Migration and accumulation of silicone in the liver of women with silicone gel-filled breast implants, *Magnet. Resonan. Med.*, 1995, 33, 8-17.
- [23] Lugowski S. J., Smith D. C., Bonek H., Lugowski J., Peters W., Semple J. Analysis of silicon in human tissues with special reference to silicone breast implants, *J. Trace Elements Med. Biol.*, 2000, 14, 31 – 42.
- [24] Anderson A. B., Robertson C. R. Absorption spectra indicate conformational alteration of mioglobin adsorbed on polydimethylsiloxane. *Biophys. J.*, 1995, 68, 5, 2091–2097.
- [25] Prokopowicz M., Łukasiak J., Banecki B., Przyjazny A. In vitro measurement of conformational stability of fibrinogen adsorbed on siloxane. *Biomacromol.*, 2005, 1, 39-45.
- [26] Birkefeld A. B., Eckert H., Pfeleiderer B. A study of the aging of silicone breast implants using <sup>29</sup>Si, <sup>1</sup>H relaxation and DSC measurements. *Biomaterials*, 2004, 25, 18, 4405-4413.
- [27] Varaprath S., McMahon J. M., Plotzke K. P. Metabolites of heksamethyldisiloxane and decametylocyclopentasiloxane in Fischer 344 rat urine – a comparison of linear and a cyclic siloxane, *Drug Metab. Disp.*, 2003, 31, 206-214.
- [28] Niar B., Final raport of safety assessment of steroxy dimethicone, dimethicone methicone, amino bispropyl dimethicone, aminopropyl dimethicone, amodimethicone, amodimethicone hydroxystearate, behenoxy dimethicone, C 24-28 alkyl methicone, C 30-45 alkyl methicone, C 30-45 alkyl dimethicone, cetearyl methicone, cetyl dimethicone, dimethylsilyl ethylenediaminopropyl dimethicone, hexyl methicone, hydroxypropyldimethicone, stearamidopropyl dimethicone, stearyl dimethicone, stearyl methicone, and vinyl dimethicone, *Int. J. Toxicol.*, 2003, 22, 11-35.
- [29] Tognetto D., Minutola D., Sanguinetti G., Ravalico G. Anatomical and Functional Outcomes after Heavy Silicone Oil Tamponade in Vutreoretical Surgery for Complicated Retinal Detachment, *Ophthalmology*, 2005, 112, 1574-1578.



- [30] WHO technical Report series 952, Evaluation of certain food additives, Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organisation, Geneva, 2009. ISBN 9789241209526.
- [31] Farmakopea Polska VIII, 2008.
- [32] European Pharmacopoeia 6.0, 2007.
- [33] British Pharmacopoeia, 2007.
- [34] US Pharmacopeia 32-NF 27, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD, 2009.
- [35] Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). <http://apps.who.int/ipsc/database/evaluations/PrintPreview.aspx?chemID=2755>
- [36] Safety evaluation of certain food additives/prepared by the sixty-ninth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA), World Health Organization 2009.
- [37] Sweetman S.C. ed. Martindale 36, The Complete Drug Reference, Pharmaceutical Press, London. ISBN 978-0-85369-840-12009.
- [38] Subedi R. K., Oh S. Y., Chun M. K., Choi H. K. Recent Advances in Transdermal Drug Delivery, Arch. Pharm. Res., 2010, 33, 3, 339-351.
- [39] Colas A. Silicones In Pharmaceutical Applications, Dow Corning Corp. 2001.
- [40] Podlewski J., Podlewska – Chwalibogowska A. Leki współczesnej terapii, Split Trading sp. z o.o., Warszawa 2009. ISBN 8385632956.
- [41] Urzędowy Wykaz Produktów Leczniczych Dopuszczonych do Obrotu na terytorium Rzeczypospolitej Polskiej, wg stanu na dzień 31 marca 2011. ISBN 978-83-88157-72-1.
- [42] Anderson S., Hedsten U., Jacobsson S. Quantitation of polydimethylsiloxane in pharmaceutical formulations by gel permeation chromatography, J. Chromatogr., 1989, 477, 474-476.
- [43] Torrado G., Garcia-Arieta A., De los Rios F., Menendez J.C., Torrado S. Quantitative determination of dimethicone in commercial tablets and capsules by Fourier transform infrared spectroscopy and antifoaming activity test, J. Pharm. Biomed. Anal., 1999, 19, 285-292.
- [44] Moore D. E., Liu T. X., Miao W. G, Edwards A., Elliss R. A RP-LC method with evaporative light scattering detection for the assay of simethicone in pharmaceutical formulations, J. Pharm. Biomed. Anal., 2002, 30, 273-278.
- [45] Jia X., Wang T., Bu X., Wu J. Isolation and analysis of trace level of silicone oil in pharmaceutical bulk drug substance by ICP-AES, Microchem. J., 2003, 75, 103-107.
- [46] International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, Q2 (R1), 2005.
- [47] World Health Organization, WHO Technical Reports Series, No. 937, Annex 4, Supplementary guidelines on good manufacturing practices: validation, 2006.
- [48] Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Analytical Procedures and Methods Validation: Chemistry, Manufacturing and Controls Documentation, 2000.
- [49] Dow Corning Corporation. Material Safety Data Sheet. Dow Corning 200 fluid, 10 cSt
- [50] Dow Corning Corporation. Material Safety Data Sheet. Dow Corning 200 fluid, 50 cSt
- [51] Dow Corning Corporation. Material Safety Data Sheet. Dow Corning 200 fluid, 350 cSt
- [52] Dow Corning Corporation. Material Safety Data Sheet. Dow Corning 200 fluid, 60 000 cSt.

## Inna działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Opracowana przez mnie metoda oznaczania polidimetylosiloksanów przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodispersyjnym została z powodzeniem już wykorzystana w innych matrycach, niż preparaty farmaceutyczne. Przykładem mogą być prace badawcze, które prowadzę we współpracy:

1. Krystyna Mojsiewicz-Pieńkowska, Marzena Jamrógiewicz, Maria Żebrowska, Małgorzata Sznitowska, Katarzyna Centkowska. Technology of an adhesive silicone film as drug carrier in transdermal therapy. I: Analytical methods used for characterization and design of the universal elastomer layers. J. Pharm. Biomed. Anal., 2011, 56, 1, 131-138. IF=2,733.
2. Grant MNiSzW NN 405 02 44 40 pt.: „Wykorzystanie metody zol-żel do otrzymywania kompozytów krzemowych jako biodegradowalne i bioaktywne systemy wszczepiane i przeznaczone do leczenia nowotworów kości”- kierownik dr inż. chem. Magdalena Prokopowicz.

### Współpraca z jednostkami

Oprócz wiodących tematów badania naukowe realizowałam na płaszczyźnie współpracy z innymi jednostkami. Do najważniejszych należy współpraca z :

Zakładem Produkcji Leków w Gdańsku, sp z o.o Ziaja Ltd., w latach 1999–2002. Współpraca polegała na opracowaniu procedury walidacji metody oznaczania alkoholu benzyłowego w preparacie krem 1% Clotrimazolum Ziaja przy wykorzystaniu RP-HPLC (wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych) wraz z przygotowaniem protokołu walidacji. Ponadto badania związane były z oznaczaniem alkoholu benzyłowego w próbkach preparatów farmaceutycznych (krem 1% Clotrimazolum Ziaja) metodą RP-HPLC i kontrolą czystości techniką TLC (chromatografii cienkowarstwowej).

W roku 2009 współpracowałam z Katedrą i Kliniką Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Stomatologicznym Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik: dr hab. med. Barbara Kamińska, prof. nadzw.). Badania dotyczyły przygotowania metodyki przydatnej w ocenie przepuszczalności jelitowej, która może być wykorzystana w diagnostyce, prognozowaniu i ocenie leczenia chorób przewodu pokarmowego, w tym choroby Crohn'a.

Od 2009 współpracuję z Katedrą i Zakładem Farmacji Stosowanej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (kierownik prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska), uczestnicząc w granicie MNiSzW N 405008 32/0528 pt.: „Silikonowe preparaty z suchym wyciągiem z cebuli i heparyną niskocząsteczkową na blizny hipertroficzne i keloidy” (kierownik projektu prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska). Praca badawcza związana jest z technologią otrzymywania adhezyjnego filmu

silikonowego, jako nośnika substancji aktywnej, przydatnego w terapii transdermalnej oraz do efektywnego leczenia blizn i keloidów.

Od 2010 roku uczestniczę, jako współwykonawca, w grantie MNiSzW NN 405 02 44 40 pt.: „Wykorzystanie metody zol-żel do otrzymywania kompozytów krzemowych jako biodegradowalne i bioaktywne systemy wszczepiane i przeznaczone do leczenia nowotworów kości” (kierownik projektu dr inż. chem. Magdalena Prokopowicz). Badania dotyczą wykorzystania opracowanej przeze mnie metody oznaczania PDMS w oparciu o chromatografię wykluczania z detektorem laserowo-fotodyspersyjnym do oceny trwałości wiązań PDMS w żelach krzemionkowych celem tworzenia hybrydowych materiałów organiczno-nieorganicznych, w różnych warunkach, w tym fizjologicznych. Wykorzystując techniki spektroskopowe, zwłaszcza FTIR, biorę udział w badaniu trwałości kserożeli tlenkowych, których komponentami są  $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$  o składzie zbliżonym do hydroksyapatytu, występującego w kościach.

Od 2011 roku biorę udział w badaniach rozpoczętych przez kierownika Katedry, w której pracuję, prof. dr. hab. Wiesława Sawickiego we współpracy z Zakładem Biofizyki i Fizyki Molekularnej Instytutu Fizyki Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach. Badania dotyczą pomiarów właściwości dielektrycznych substancji leczniczych oraz poszukiwania optymalnych metod otrzymywania form amorficznych w celu zwiększenia ich rozpuszczalności oraz poprawy parametrów granulometrycznych i zdolności do tabletkowania. Efektem tej współpracy jest zgłoszenie patentowe pt.: „Otrzymywanie amorficznego indapamidu”, w którym jestem współtwórcą.

## **Inna działalność naukowo-badawcza**

### **Udział w projektach badawczych**

W trakcie pracy badawczej brałam udział w realizacji następujących projektów:

1. Grant KBN Nr 2P 303 04205: „Badanie zawartości polidimetylosiloksanów w środkach spożywczych” – jako kierownik projektu, 1993.
2. Grant KBN Nr 3 T09 08408: „Specjacyjna analityka związków krzemowych w niektórych środkach spożywczych” – jako kierownik projektu, 1995.
3. Grant KBN Nr 4P 05D06612: „Opracowanie metody analizy specjacyjnej polidimetylosiloksanów i produktów ich transformacji w środkach spożywczych” – jako współwykonawca, czas realizacji 1997-1998.

Projekt wyróżniony przez Departament Informacji i Promocji KBN, opublikowany w Serwisie Informacji Naukowej i Technicznej – przegląd Eureka, zeszyt 1/2001 str. 14.

4. Grant MNiSzW N 405008 32/0528 pt.: „Silikonowe preparaty z suchym wyciągiem z cebuli

i heparyną niskocząsteczkową na blizny hipertroficzne i keloidy” (kierownik projektu: prof. dr hab. Małgorzata Sznitowska) – jako współwykonawca, czas realizacji 2007-2011.

5. Grant MNiSzW NN 405 02 44 40 pt.: „Wykorzystanie metody zol-żel do otrzymywania kompozytów krzemowych jako biodegradowalne i bioaktywne systemy wszczepiane i przeznaczone do leczenia nowotworów kości” (kierownik projektu: dr inż. chem. Magdalena Prokopowicz) – jako współwykonawca, czas realizacji 2010-2013.

6. Realizacja w charakterze kierownika projektu w cyklu dwu i trzyletnim 7 prac własnych finansowanych przez Akademię Medyczną w Gdańsku, a następnie Gdański Uniwersytet Medyczny.

W latach 2006 – 2010 przygotowałam i wysłałam do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, jako kierownik projektów, łącznie 6 wniosków o finansowanie badań, jednego rozwojowego i 5 własnych, uzyskując następujące oceny: projekt dobry – 3 krotnie, projekt bardzo dobry – 7 krotnie, projekt wyróżniający się 5 krotnie.

### **Zgłoszenie patentowe**

Jestem współtwórcą, spośród 7 twórców, w zgłoszonym patencie pt.: „Sposób otrzymywania amorficznego indapamidu. Zgłoszenie patentowe nr P.396354 z dnia 16.09.2011.

### **Przygotowanie polskojęzycznej wersji monografii Farmakopei Europejskiej**

W 2010 roku dla Wydziału Farmakopei Urzędu Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych przygotowałam polskojęzyczną wersję monografii Farmakopei Europejskiej: 2.2.64. Peptide identification by nuclear magnetic resonance spectrometry. Monografia ta zawarta w szóstym wydaniu Farmakopei Europejskiej będzie zamieszczona w wydaniu IX w Farmakopei Polskiej.

### **Nagrody i stypendia**

1. W roku 1996 otrzymałam nagrodę zespołową Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za osiągnięcia naukowe II stopnia, dotyczące cyklu prac poświęconych analityce specjacyjnej.
2. W roku 1999 otrzymałam przez Radę Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Gdańsku wyróżnienie rozprawy doktorskiej pt. „Ocena zawartości związków krzemu w środkach spożywczych”.
3. W roku 2004 otrzymałam nagrodę zespołową Rektora Akademii Medycznej w Gdańsku za osiągnięcia naukowe II stopnia, dotyczące cyklu prac poświęconych analitycznym, środowi-

skowym i molekularnym aspektem badań nad silikonami.

4. W roku 2010 otrzymałam nagrodę indywidualną I stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego za osiągnięcia naukowe, dotyczące cyklu prac związanych z tematem „Innowacyjne rozwiązanie w problematyce kontroli analitycznej polidimetylosiloksanów stosowanych w preparatach farmaceutycznych”.

5. Decyzją Senackiej Komisji Nauki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego otrzymałam stypendium habilitacyjne w okresie 1 maja 2010 – 30 kwietnia 2011.

### **Wygłoszone referaty i komunikaty naukowe**

Uzyskane wyniki zostały zaprezentowane w formie pięciu referatów i sześciu komunikatów, które wygłosiłam na krajowych konferencjach i sympozjach naukowych.

1. Referat: Konieczność monitorowania związków krzemu w środkach spożywczych w świetle ich immunotoksyczności. Sympozjum "Jakość zdrowotna żywności i przedmiotów użytku", Warszawa, 18-19 września 1997.

2. Referat: Analiza specjacyjna związków krzemu w środkach spożywczych. VI Polska Konferencja Chemii Analitycznej "Chemia analityczna u progu trzeciego tysiąclecia", Gliwice, 9-14 lipca 2000.

3. Referat proszony: Poszukiwanie nowych sposobów detekcji polidimetylosiloksanów. XIV Poznańskie Konwersatorium Analityczne, Szkoła Naukowa Analityka Leków, Nowoczesne metody przygotowania próbek i oznaczania śladowych ilości pierwiastków. Poznań, 12-13 maja 2005.

4. Referat: Application of a laser light-scattering detector to analysis of polydimethylsiloxanes. XLVIII Annual Meeting of the Polish Chemical Society and the Association of Engineers & Technicians of Chemical Industry, Poznań, 18-22 września, 2005.

5. Referat: Possibilities of linear polydimethylsiloxanes determination using size exclusion chromatography with a laser light-scattering detector. XLVIII Annual Meeting of the Polish Chemical Society and the Association of Engineers & Technicians of Chemical Industry, Poznań, 18-22 września, 2005.

6. Komunikat: Specjacyjna analityka ilościowa jonów glinowych (III) i żelazowych (III) w wodzie metodą spektroskopii UV-VIS. Sympozjum „Związki organiczne w środowisku i metody ich oznaczania”, Jachranka 23-27 maja 1994.

7. Komunikat: Oznaczenie ilościowe i specjacja związków krzemu w niektórych środkach spożywczych. Symposium „Związki organiczne w środowisku i metody ich oznaczania”, Jachranka 23-27 maja 1994.

8. Komunikat: Ocena przydatności metod ASA, IR oraz  $^1\text{H-NMR}$  do oznaczania polidimetylosiloksanów w próbkach żywności. Ogólnopolskie sympozjum „Wartość zdrowotna i zanieczyszczenia żywności”, Ogólnopolska Sekcja Bromatologiczna Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Gdańsk, 18-19 września 2003.

9. Komunikat: Możliwości oznaczania polidimetylosiloksanów metodą chromatografii wykluczania z wykorzystaniem detektora laserowego fotodyspersyjnego. XLVIII Zjazd Naukowy Polskiego Towarzystwa Chemicznego i Stowarzyszenia Inżynierów i Techników Przemysłu Chemicznego, Poznań, 18-22 września 2005.

10. Komunikat: Wykorzystanie chromatografii wykluczania do identyfikacji polidimetylosiloksanów liniowych. XIII Ogólnopolskie Sympozjum Krzemooorganiczne, Chmielno, 17-19 września 2007.

11. Komunikat: Możliwości identyfikacji dimeticonum i simeticonum w preparatach farmaceutycznych. XXI Naukowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego "Farmacja polska na tle Unii Europejskiej", Gdańsk, 12-15 września 2010.

### **Recenzowanie manuskryptów dla czasopism**

1) eXPRESS Polymer Letters (IF=1.575). Rok 2008 – recenzja manuskryptu z dziedziny dotyczącej badań analitycznych polimerów.

2) Talanta wyd. Elsevier (IF = 3,206). Rok 2008 – recenzja manuskryptu z dziedziny dotyczącej opracowania metody identyfikacji i oznaczania 16 metabolitów wpływających na niedorozwój układu nerwowego u embrionów w oparciu o metodę LC/MS/MS.

3) Talanta wyd. Elsevier (IF = 3,206). Rok 2009 – recenzja manuskryptu z dziedziny dotyczącej przygotowania i scharakteryzowania kolumn monolitycznych.

4) Talanta wyd. Elsevier (IF = 3,206). Rok 2009 – recenzja manuskryptu z dziedziny dotyczącej izolacji, badań jakościowych 8 związków czynnych metodą HPLC – ESI – MS oraz ilościowych kwasu chlorogenowego metodą HPLC – RP-DAD, występujących w 3 gatunkach roślin.

5) eXPRESS Polymer Letters (IF=1.575). Rok 2010 – recenzja z dziedziny otrzymywania, oceny morfologii i właściwości emulsji typu core-shell wskutek polimeryzacji emulsyjnej z dodatkiem surfaktantu reaktywnego (surfmer).

- 6) Talanta wyd. Elsevier (IF=3,722). Rok 2010 – recenzja z dziedziny analizy specjacyjnej związków rtęci przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej ze spektrometrią mas z plazmą wzbudzoną indukcyjnie (CE-ICP-MS).
- 7) Talanta wyd. Elsevier (IF=3,722). Rok 2010 – recenzja z dziedziny analizy metabolomicznej, polegającej na oznaczaniu biomarkerów przydatnej w diagnostyce choroby Kidney-Yang Deficiency Syndrome, przy wykorzystaniu Ultra Sprawnej Chromatografii Cieczowej ze Spektrometrią Mas (UPLC/MS).
- 8) Talanta wyd. Elsevier (IF=3,722). Rok 2010 – recenzja z dziedziny analizy specjacyjnej związków selenu przy zastosowaniu HPLC-IC-MS.
- 9) Talanta wyd. Elsevier (IF=3,722). Rok 2011 – recenzja z dziedziny analizy resveratrolu, koniugatów resveratrolu oraz metabolitów powstałych in vivo przy wykorzystaniu NMR oraz HPLC z detektorem UV, fluorescencyjnym i Spektrometrii Mas.
- 10) Journal of Chromatography A (IF = 4,194). Rok 2011 – recenzja z dziedziny oznaczania węglowodanów w tym polimerów węglowodanowych przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym.
- 11) Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis wyd. Elsevier (IF= 2,733). Rok 2011 – recenzja z dziedziny opracowania metody jednoczesnego oznaczania związków w liofilizowanej trombinie przy wykorzystaniu chromatografii wykluczania z detektorem laserowo fotodyspersyjnym.
- 12) Talanta wyd. Elsevier (IF=3,722). Rok 2011 – recenzja z dziedziny analizy specjacyjnej 3 związków rtęci w próbkach środowiskowych przy zastosowaniu techniki sprzężonej HPLC-ICP-MS.

Gdańsk, 21.10.2011      Pieńkowski