



**Alina Plenis**

**Omówienie cyklu publikacji pt.**

**WIELOWYMIAROWA OCENA DANYCH  
CHROMATOGRAFICZNYCH W ANALIZACH  
FARMACEUTYCZNYCH, BIOMEDYCZNYCH  
I ŚRODOWISKOWYCH**

**Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Gdańsk, 2014**

**1. Imię i nazwisko:** Alina Plenis

## **2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe**

W latach 1986-1991 studiowałam na Wydziale Matematyki-Fizyki-Chemii Uniwersytetu Gdańskiego na kierunku Chemia. W roku 1991 obroniłam pracę magisterską pt. „*Kompleksowe metody zwalczania szkodliwych gatunków owadów*”, którą przygotowałam w Zakładzie Analizy Środowiska pod kierunkiem prof. dra hab. inż. Janusza Szafranka uzyskując tytuł magistra chemii. Rozprawę doktorską pt. „*Opracowanie metody oznaczania moklobemidu i jego dwóch metabolitów w osoczu krwi ludzkiej oraz jej zastosowanie w badaniach farmakokinetycznych*” wykonałam pod kierunkiem kierownika Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej) prof. dra hab. Henryka Lamparczyka. Obroniłam ją 7 grudnia 2004 roku uzyskując stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych.

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

15 września 1997 roku zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) na stanowisku asystenta. 1 marca 2006 roku awansowałam na stanowisko adiunkta, na którym pracuję do chwili obecnej.

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

Tematem wiodącym prezentowanych osiągnięć naukowych była wielowymiarowa ocena danych chromatograficznych, celem usprawnienia opracowywania metod oznaczania substancji leczniczych technikami chromatograficznymi, a następnie efektywnych aplikacji metod HPLC i GC do analizy rzeczywistych próbek farmaceutycznych, biomedycznych i środowiskowych. Wyniki badań zostały opisane w formie monotematycznego cyklu wymienionych poniżej prac, opublikowanych w latach 2011-2013, o łącznym współczynniku oddziaływania  $IF = 31,412$  i wartości punktacji  $MNiSW = 330$ .

- H1.** A. Plenis, L. Konieczna, N. Miękus, T. Bączek, Development of the HPLC method for simultaneous determination of lidocaine hydrochloride and tribenoside along with their impurities supported by the QSRR approach, *Chromatographia*, 76 (2013) 255-265. (IF = 1,437; MNI<sub>SW</sub> = 20)
- H2.** J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Evaluation of a column classification method using the separation of alfuzosin from its related substances, *J. Chromatogr. A*, 1229 (2012) 198-207. (IF = 4,612; MNI<sub>SW</sub> = 40)
- H3.** J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Application of a column classification method in a selectivity study involving caffeine and its related impurities, *Talanta*, 99 (2012) 492-501. (IF = 3,498; MNI<sub>SW</sub> = 40)
- H4.** J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Chemometric evaluation of the column classification system during the pharmaceutical analysis of lamotrigine and its related substances, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 6529-6541. (IF = 3.659; MNI<sub>SW</sub> = 40)
- H5.** A. Plenis, E. Balakowska, T. Bączek, The comparison of two column classification systems during the chromatographic analysis of steroids, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 3310-3321. (IF = 2,733; MNI<sub>SW</sub> = 30)
- H6.** A. Plenis, I. Olędzka, T. Bączek, Classification of LC columns based on the QSRR method and selectivity toward moclobemide and its metabolites, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 78-79 (2013) 161-169. (IF = 2,947; MNI<sub>SW</sub> = 30)
- H7.** J. Kumirska, N. Migowska, M. Caban, A. Plenis, P. Stepnowski, Chemometric analysis for optimizing derivatization in gas chromatography-based procedures, *J. Chemometr.*, 25 (2011) 636-643. (IF = 1,952; MNI<sub>SW</sub> = 35)
- H8.** J. Kumirska, A. Plenis, P. Łukaszewicz, M. Caban, N. Migowska, A. Białk-Bielińska, M. Czerwicka, P. Stepnowski. Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A*, 1296 (2013) 164-178. (IF = 4,612; MNI<sub>SW</sub> = 40)

**H9. A. Plenis**, L. Konieczna, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of urinary cortisol, cortisone and corticosterone in parachutists, depressed patients and healthy controls in view of biomedical and pharmacokinetic studies, *Mol. Biosyst.*, 7 (2011) 1487-1500. (IF = 3,534; MNiSW = 30)

**H10. A. Plenis\***, N. Miękus, I. Olędzka, T. Bączek, A. Lewczuk, Z. Woźniak, P. Koszałka, B. Seroczyńska, J. Skokowski, Chemometric Evaluation of Urinary Steroid Hormone Levels as Potential Biomarkers of Neuroendocrine Tumors, *Molecules*, 18 (2013) 12857-12876. (IF = 2,428; MNiSW = 25)

\* Pełniłam funkcję autora korespondencyjnego

## WPROWADZENIE

### 1. Metody chemometryczne

Dynamiczny rozwój nauk analitycznych generujących znaczące ilości danych pomiarowych stał się głównym czynnikiem stymulującym poszukiwania metod analizy danych pochodzących z różnorodnych eksperymentów naukowych bądź procesów technologicznych. Już w latach trzydziestych XX wieku powstały załączki chemometrii, kiedy to rozpoczęto pierwsze badania zmierzające do opracowania metod jednoczesnej analizy wielowymiarowej zbiorów danych [1]. Aktualnie definiujemy chemometrię jako dyscyplinę zaliczaną do nauk chemicznych zajmującą się wydobywaniem użytecznej informacji z wielowymiarowych danych pomiarowych, wykorzystującą statystykę i metody numeryczne [2]. Chemometrię można zatem traktować jako szereg uporządkowanych i zaplanowanych procedur, które należy wykonać, aby uzyskać możliwie pełną informację o obiekcie badań. Wśród wielu technik chemometrycznych, dużą popularność zyskały m.in. analiza czynnikowa (*Factor Analysis – FA*) [3], analiza składowych głównych (*Principal Component Analysis – PCA*) [4] i analiza skupień (*Cluster Analysis – CA*) [5].

Nowoczesne techniki chemometryczne niezależnie od zastosowanego algorytmu pozwalają na jednoczesne opracowanie praktycznie nieograniczonej liczby zmiennych, co sprawia, że zakres ich praktycznego zastosowania systematycznie się rozszerza. Pomimo to, nadal pozostają dziedziny nauk badające różnorodne zjawiska i procesy,

w tym chromatografia, w których tylko częściowo został wykorzystany wachlarz potencjalnych możliwości zastosowań analiz chemometrycznych.

## ***2. Obszary potencjalnych aplikacji technik chemometrycznych w analizach chromatograficznych substancji leczniczych w próbkach farmaceutycznych, biologicznych i środowiskowych***

Efektywne zastosowanie technik chromatograficznych w analizach jakościowo-ilościowych substancji czynnych i ich metabolitów czy też związków endogennych w matrycach biologicznych (np. osoczu, surowicy, krwi), substancji macierzystych i ich zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych (np. tabletkach, kapsułkach, maściach, kremach), a także leków w próbach środowiskowych (np. akwenach wodnych: rzeki, jeziora, morze, wodach głębinowych czy glebie) wymaga opracowania odpowiednich metod chromatograficznych, które nie tylko spełniają odpowiednie kryteria walidacyjne, ale także umożliwiają oznaczenie związków na poziomie wymaganym dla danej aplikacji farmaceutycznej, biomedycznej czy środowiskowej. To z kolei uwarunkowane jest doбором optymalnych warunków procedury ekstrakcji oznaczanych substancji z materiału badawczego, właściwym przygotowaniem próbki do analizy chromatograficznej, a także przeprowadzeniem procesu optymalizacji warunków analizy chromatograficznej, włączając m.in. wybór odpowiedniej fazy stacjonarnej.

Obecnie, szacuje się, że około 80-90% rozdzieleń związków przeprowadza się za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz (ang. *reversed-phase high-performance liquid chromatography*, RP-HPLC; RP-LC), a kolumny chromatograficzne do RP-HPLC stanowią ponad 80% handlowo dostępnych kolumn na rynku ogólnoswiatowym [6]. Warto jednak podkreślić, że liczne fazy stacjonarne w swoim opisie są nominalnie identyczne, co sugeruje podobieństwo właściwości retencyjnych. Z drugiej strony, struktura chemiczna i konfiguracja przestrzenna ligandów, gęstość upakowania ligandów, długość łańcuchów węglowodorowych, natura materiału nośnika może skutkować wystąpieniem różnic w liczbie pól teoretycznych, kształcie piku, retencji, selektywności i czasie przydatności do użycia. Te odmienności mogą poważnie wpływać na selektywność danej fazy stacjonarnej, a tym samym istotnie zmieniać wynik analizy chromatograficznej [7,8]. To zaś powoduje, że wybór optymalnej kolumny do konkretnego rozdzielania chromatograficznego jest trudny i skłania analityków do zwiększonego zainteresowania

charakterystyką i klasyfikacją kolumn w odwróconym układzie faz. Wynikiem tego był intensywny rozwój badań prowadzących do powstawania licznych, klasycznych testów chromatograficznych oraz bardziej złożonych systemów klasyfikacji kolumn.

### 2.1. Ocena wiarygodności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej i biomedycznej

Pionierami w dziedzinie klasyfikacji kolumn chromatograficznych byli Taft i Kamlet [9], a kontynuacja badań doprowadziła początkowo do prostych testów klasyfikacyjnych [10,11], a później do coraz bardziej złożonych systemów ich klasyfikacji [12-15]. Wśród nich należy wymienić m.in. oryginalną strategię badawczą opartą na ilościowych zależnościach struktura-retencja (ang. *Quantitative Structure-Retention Relationships*, QSRR) [16-18], w której określa się zależności pomiędzy parametrami retencji chromatograficznej analitów a deskryptorami strukturalnymi.

Najprostszym modelem QSRR jest regresja retencji wyrażonej w postaci wartości  $\log k$  ekstrapolowanego do czystej wody, czyli  $\log k_w$ , który odzwierciedla w sposób najbardziej wiarygodny różnice w hydrofobowości między analitami względem teoretycznie obliczonego logarytmu współczynnika podziału *n*-oktanol/woda ( $\log P$ ) [19,20]. Równanie regresji przyjmuje wówczas postać:

$$\log k_w = a_1 + a_2 \log P \quad (1)$$

gdzie:  $a_1$  i  $a_2$  to współczynniki regresji.

W kolejnym modelu QSRR retencja uzależniona jest od deskryptorów uzyskanych przy wykorzystaniu modelowania molekularnego tj.

- momentu dipolowego,  $\mu$  – odzwierciedlającego oddziaływania dipol-dipol oraz oddziaływania dipol-dipol indukowany pomiędzy analitem a fazą ruchomą i stacjonarną;
- największego ujemnego atomowego ładunku nadmiarowego w cząsteczce,  $\delta_{Min}$  – określającego miejscową polarność analitu oraz zdolność do udziału w polarnych interakcjach takich jak oddziaływania międzycząsteczkowe dipol-dipol, przeniesienia ładunku, a także reakcje przyłączenia wodoru;

- powierzchnię dostępną do kontaktu z rozpuszczalnikiem,  $A_{WAS}$  – opisującą siłę oddziaływań dyspersyjnych (typu Londonowskiego) analitu z molekułami fazy ruchomej i stacjonarnej.

a równanie QSRR kształtuje się następująco:

$$\log k_w = a'_1 + a'_2 \mu + a'_3 \delta_{Min} + a'_4 A_{WAS} \quad (2)$$

gdzie:  $a'_1$ ,  $a'_2$ ,  $a'_3$ ,  $a'_4$  to współczynniki regresji.

Kolejny system został opracowany przez naukowców z Katholieke Universiteit Leuven w Belgii (tzw. metoda KUL) [21-23]. Klasyfikacja przy użyciu systemu KUL odnosi się do kolumn z łańcuchem  $C_{18}$  i jest oparta na trzech ściśle zdefiniowanych procedurach, które umożliwiają wyznaczenie następujących parametrów: współczynnika retencji amylobenzenu ( $k_{amb}$ ) opisującego hydrofobowość kolumny, względnego współczynnika retencji benzyloamina/fenol w pH 2,7 ( $rk_{ba/ph \text{ pH } 2,7}$ ) określającego aktywność silanolową, względnego współczynnika retencji trifenylen/*o*-terfenyl ( $rk_{tri/ter}$ ) charakteryzującego selektywność przestrzenną oraz współczynnika retencji 2,2'-dipirydylu ( $k_{2,2'-d}$ ) opisującego aktywność silanolową i stopień zanieczyszczenia metalami ciężkimi. W efekcie, wszystkie kolumny w systemie KUL są opisane poprzez wartości wyżej wymienionych parametrów, a to z kolei umożliwia wyznaczenie parametru  $F$  określającego podobieństwo tychże parametrów w odniesieniu do kolumny odniesienia. Zatem, należy kolumnę referencyjną zdefiniować na wstępie badań metodą KUL, a następnie na podstawie wzoru podanego poniżej wyznaczyć wartość parametru  $F$ :

$$F = (k_{amb,ref} - k_{amb,i})^2 + (rk_{ba/ph \text{ 2,7, ref}} - rk_{ba/ph \text{ 2,7,i}})^2 + (rk_{tri/ter, ref} - rk_{tri/ter,i})^2 + (k_{2,2'-d, ref} - k_{2,2'-d,i})^2 \quad (3)$$

gdzie:  $ref$  – kolumna odniesienia (referencyjna),  $i$  – kolumna badana

To znacznie upraszcza system rankingowy kolumn, ponieważ istnieje zależność, że im mniejsza wartość parametru  $F$ , tym faza stacjonarna jest bardziej podobna do kolumny referencyjnej. Z doniesień literaturowych wynika, że wyniki uzyskane metodą KUL są porównywalne względem innych systemów ich klasyfikacji [24,25].

Z praktycznego punktu widzenia najistotniejszym parametrem decydującym o sukcesie każdego systemu klasyfikacji kolumn jest potwierdzenie jego przydatności w praktyce farmaceutycznej i klinicznej, co można udowodnić wykazując, że fazy stacjonarne scharakteryzowane jako podobne, będą generowały zbliżone wyniki analiz chromatograficznych. W przypadku metody KUL badania dotyczyły rozdzielania nie tylko kwasu acetylosalicylowego i jego zanieczyszczeń [26], ale także oznaczania innych substancji leczniczych techniką RP-LC [24,25,27-29]. Wyniki tych badań dowiodły, że metoda KUL jest użytecznym narzędziem analitycznym, który ułatwia wybór optymalnej fazy stacjonarnej do danej analizy chromatograficznej. Trzeba jednak zauważyć, że ocena wiarygodności systemu KUL w praktyce farmaceutycznej opierała się wyłącznie na analizie porównawczej wyników opisujących wartości parametru  $F$  wyznaczonych dla badanych faz stacjonarnych względem danych opisujących wyniki testu farmakopealnego tzw. testu SST (ang. *System Suitability Test*) lub parametru CRF (ang. *Chromatographic Response Function*). Jednakże oba parametry jedynie określają doświadczalnie wyznaczoną całościową selektywność dla wybranych związków. To oznacza, że oba parametry wskazywały tylko ogólny opis analizy farmaceutycznej bez możliwości wykazania, czy fazy stacjonarne sklasyfikowane jako porównywalne za pomocą systemu KUL rzeczywiście gwarantują uzyskanie wyników analizy farmaceutycznej analogicznych do obserwowanych dla kolumny referencyjnej. Zatem należało podjąć badania, które doprowadzą do opracowania nowego testu oceniającego wiarygodność systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej opartego na wielowymiarowej ocenie danych eksperymentalnych. Techniki wielowymiarowej analizy danych były już wprawdzie wcześniej stosowane do oceny podobieństw i różnic we właściwościach fizykochemicznych faz stacjonarnych wyznaczonych różnorodnymi systemami ich klasyfikacji, ale ich aplikacja dotyczyła wyłącznie etapu klasyfikowania kolumn chromatograficznych [14,15,19,21,24,30-32]. Jednocześnie, wskazane było przeprowadzenie oceny wiarygodności systemu klasyfikacji kolumn metodą QSRR w praktyce farmaceutycznej. Z danych literaturowych wynikało bowiem, że metodę QSRR testowano względem innych systemów klasyfikacji faz stacjonarnych korelując dane teoretyczne [17,19,33], ale test praktycznej aplikacji farmaceutycznej nie został dotychczas przeprowadzony.

Kolejnym istotnym nurtem badań, które prezentuję w niniejszym osiągnięciu naukowym było sprawdzenie przydatności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych metodami KUL i QSRR w rzeczywistych analizach biomedycznych.



Wyniki takich analiz mają bowiem istotne znaczenie dla wielu analityków klinicznych poszukujących nowych narzędzi wspomagających proces efektywnego opracowywania optymalnych metod chromatograficznych stosowanych do oznaczania substancji leczniczych i ich metabolitów w różnorodnych matrycach biologicznych. Brak doniesień w literaturze światowej dowodził jednak, że ten ważny problem analitycznych był wciąż pomijany.

## *2.2. Zastosowanie technik chemometrycznych do optymalizacji procesów derywatywacji substancji leczniczych w próbkach środowiskowych*

Aktualnie, wiodącą techniką analityczną do oznaczania pozostałości związków biologicznie czynnych w środowisku jest chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas (LC-MS) lub tandemowa spektrometria mas (LC-MS/MS) [34]. Jej główną zaletą jest przede wszystkim uniwersalność działania, uproszczony etap przygotowania próbek do analizy czy łatwość automatyzacji procedury analitycznej. Istotnymi ograniczeniami są natomiast m.in. interferencje analitów ze składnikami matrycy czy zakłócenia procesów jonizacji i fragmentacji związków wynikające z oddziaływań składników matrycy z fazą ruchomą, które powodują znaczące obniżenie jakości rozdzieleń chromatograficznych oraz spadek czułości oznaczeń [35]. Alternatywnym narzędziem analitycznym staje się wówczas chromatografia gazowa (GC) oraz chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas (GC-MS bądź GC-MS/MS), która umożliwia wykonanie specyficznych analiz GC charakteryzujących się wysoką czułością, precyzją i dokładnością oznaczeń przy obniżonych kosztach ich wykonania [36]. Istotnym atutem jest także mniejsze zużycie rozpuszczalników, co ma istotne znaczenie *pro* środowiskowe. Niestety, często wiąże się to z koniecznością przeprowadzania procesu derywatywacji związków polarnych i/lub nielotnych przed analizą GC, który polega na przeprowadzeniu analitów, w wyniku reakcji chemicznej w odpowiednie pochodne o właściwościach umożliwiających ich oznaczenie [37,38]. Najczęściej stosowanymi metodami derywatywacji związków organicznych jest *silylowanie*, *acylowanie* i *alkilowanie*. Proces derywatywacji analitów należy przeprowadzić tak, aby wybrany odczynnik reagował z oznaczanym związkiem ilościowo i szybko, nie dawał reakcji ubocznych, a jego nadmiar mógł być łatwo usuwany ze środowiska reakcji. W efekcie, wykonuje się szereg czaso- i pracochłonnych eksperymentów, ponieważ liczba nowych odczynników do konwersji chemicznej stale

wzrasta, a ponadto powinny być one przetestowane w różnorodnych warunkach eksperymentalnych. Problem narasta, gdy chcemy oznaczać dużą liczbę analitów podczas jednego przebiegu chromatograficznego, a stężenie analitów w analizowanych próbkach jest śladowe. Istotnym utrudnieniem może być także zróżnicowana budowa chemiczna oznaczanych związków. W efekcie, generowana jest znacząca liczba danych pomiarowych, co znacząco utrudnia ostateczny wybór optymalnego odczynnika i parametrów procedury derywatywacyjnej. Wówczas pomocniczymi narzędziami stają się techniki chemometryczne. Jednakże, poza planami Boxa-Behnkena i testem ANOVA [39-41], brak było doniesień naukowych wskazujących na zastosowanie technik chemometrycznych celem usprawnienia procedury optymalizacji warunków derywatacji analitów przed analizą GC.

### *2.3. Ocena wiarygodności oznaczeń biomarkerów zaburzeń zdrowotnych człowieka wsparta chemometryczną analizą końcowych wyników pomiarowych*

Kolejnym obszarem zastosowań chemometrii dotychczas nie w pełni docenionym, jest etap opracowania wyników badań i ich dalszej interpretacji, który tworzy podstawę do formułowania ostatecznych wniosków płynących z wykonanych doświadczeń naukowych. Wprawdzie w literaturze znajdziemy znaczącą liczbę prac opisujących zastosowanie różnorodnych technik chemometrycznych do graficznej prezentacji wyników badań [42-44], ale umieszczone w pracach dyskusje wyników dowodzą, że potencjalne możliwości chemometrii, pozwalające poprzez odkrywanie zależności występujących pomiędzy zmiennymi i obiektami uzyskać maksymalnie dużą ilość informacji o badanym zjawisku (procesie), nie zostały w pełni wyeksponowane. Przykładem tego typu aplikacji mogą być m.in. badania dotyczące poszukiwania biomarkerów różnorodnych jednostek chorobowych. Biomarkery ze względu na istotne znaczenie diagnostyczne i rokownicze w przebiegu choroby, mogą skutecznie zwiększyć efektywność prowadzonych terapii klinicznych. Wśród nich możemy wyróżnić m.in. glikokortykosteroidy (kortyzol, kortyzon i kortykosteron) oraz hormony płciowe: testosteron, epitestosteron i progesteron, które są miernikami wielu dysfunkcji organizmu [45]. Wykazano m.in., że wydzielanie kortyzolu i kortyzonu (nieaktywnego metabolitu kortyzolu) znacząco wzrasta podczas treningu i/bądź udziału w zawodach sportowych, a także w sytuacjach stresogennych i lękowych [46-48]. Potwierdzono podwyższony poziom obu glikokortykosteroidów w osoczu u pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi

[49,50]. W innych badaniach oznaczono wyższe wartości kortyzolu i kortyzonu u kobiet z depresją [51,52], podczas gdy takich zmian nie odnotowano u mężczyzn [52]. Jednakże, w literaturze światowej pojawiły się także doniesienia wskazujące na brak wpływu zaburzeń depresyjnych na sekrecję i metabolizm glikokorykosteroidów [53]. To dowodzi, że wyniki badań są niejednoznaczne.

Innym istotnym problemem klinicznym jest diagnozowanie guzów neuroendokrynych (ang. *neuroendocrine tumours* - NET), które należą do grupy powoli rosnących nowotworów pochodzenia nabłonkowego wywodzących się z pierwotnej neuroektodermi [54]. Klasyfikowane są jako guzy rzadkie: stanowią ok. 2% wszystkich nowotworów z częstością występowania poniżej 5 przypadków/100000/rok [55]. Badania pośmiertne wskazują jednakże, iż ich występowanie jest częstsze, niż się powszechnie uważa. Przebieg kliniczny jest determinowany zespołem objawów wynikających z działania hormonów i substancji biologicznie czynnych produkowanych przez komórki NET [56]. Jednakże, często niespecyficzny charakter zaburzeń utrudnia prawidłową diagnostykę NET znacznie podwyższając prawdopodobieństwo niepomyślnych rokowań dla pacjentów ze stwierdzonymi guzami neuroendokrynymi, pomimo że wprowadzono szereg biomarkerów NET, m.in. chromograninę A, neurospecyficzną enolazę (NSE), substancję P czy kwas 5-hydroksyindolo-3-octowy (5-HIAA) [57-59]. Z drugiej strony, nasza wiedza w zakresie pełnego poznania mechanizmów biologicznej regulacji wzrostu guzów neuroendokrynych jest nadal niepełna, co dodatkowo utrudnia wczesną diagnostykę i leczenie pacjentów z NET. Przykładem jest m.in. brak doniesień literaturowych oceniających, czy istnieją korelacje pomiędzy rozwojem NET a sekrecją, metabolizmem i wydalaniem hormonów steroidowych.

Należy jednak podkreślić, że poziomy stężenie hormonów steroidowych są zależne od dobowego i miesięcznego rytmu wydzielania [60,61] i wskazują znaczące różnicowanie osobnicze. To sprawia, że w badaniach klinicznych grupy kontrolne zdrowych ochotników względem grup pacjentów powinny być szczególnie starannie dobierane. Dopiero wówczas ostateczne wyniki badań są wiarygodne. Przykładem mogą być pomiary kortyzolu, dla którego prawidłowe zakresy stężeń w moczu mieszczą się w przedziale 50-250 ng/ml, a najwyższe ich wartości powinny być osiągnięte w godzinach porannych (6.00-8.00). Jednakże z danych literaturowych wynika, że wolna frakcja tego hormonu u zdrowych ochotników była oznaczana zarówno w niskich (20-40 ng/ml) [62,63] jak i wysokich (50-250 ng/ml) [64,65] zakresach stężeń. Uzyskanie tak rozbieżnych wyników mogło wynikać z zastosowanej metodyki badawczej [66,67], bądź

być skutkiem znaczącego zróżnicowania osobniczego, o którym wcześniej wspominałam. Zatem, dla zwiększenia poprawności analiz zalecane jest staranne dobieranie grup kontrolnych, korelowanie danych pomiarowych uzyskanych tą samą metodą analityczną oraz przeprowadzenie właściwej oceny statystycznej wyników pomiarowych. W tej sytuacji, przeprowadzenie etapu opracowania i interpretacji uzyskanych wyników poprzez wizualizację relacji występujących w wielowymiarowym zbiorze danych oraz pogłębioną analizą rozpoznawczą wewnętrznej struktury danych może dostarczyć analitykom i klinicytom wielu dodatkowych cennych informacji o substancjach pełniących funkcję biomarkera różnorodnych jednostek chorobowych.

## **CEL BADAŃ**

Problematyka poruszonych powyżej zagadnień naukowych stała się inspiracją moich badań, których wyniki zostały przedstawione w dziesięciu publikacjach [H1-H10] tworzących prezentowane osiągnięcie naukowe. Ich celem było nowatorskie zastosowanie technik chemometrycznych w analizach farmaceutycznych, biomedycznych i środowiskowych, które zwiększyłyby efektywność zastosowań HPLC i GC do oznaczania substancji leczniczych w próbkach farmaceutycznych, biologicznych i środowiskowych. Realizacja celu nadrzędnego wymagała przeprowadzenia badań szczegółowych, które dotyczyły:

- I. Oceny wiarygodności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej i biomedycznej z zastosowaniem testu bazującego na wielowymiarowej ocenie danych eksperymentalnych, w tym:
  - ✚ ocena przydatności systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej opartego na metodzie QSRR,
  - ✚ ocena przydatności systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej opartego na metodzie KUL,
  - ✚ ocena wiarygodności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce biomedycznej opartych na metodzie KUL i QSRR.
- II. Zastosowania technik chemometrycznych do optymalizacji procesu derywatywacji substancji leczniczych w próbkach środowiskowych.
- III. Przeprowadzenia badań dotyczących oceny wiarygodności oznaczeń hormonów steroidowych jako biomarkerów stanów psychofizycznych człowieka wspartych chemometryczną analizą końcowych wyników pomiarowych.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

### ***I. Oceny wiarygodności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej i biomedycznej z zastosowaniem testu bazującego na wielowymiarowej ocenie danych eksperymentalnych***

Jak wcześniej wspomniałam, częstym problemem, przed którym staje analityk przy opracowywaniu każdej nowej metody chromatograficznej jest dobór optymalnej fazy stacjonarnej. W analogicznej sytuacji znajduje się badacz, gdy dana metoda chromatograficzna została wcześniej zdefiniowana w farmakopei [68,69] bądź w literaturze naukowej, ale laboratorium nie dysponuje tego typu fazą stacjonarną. Pomocnymi narzędziami mogą stać się wówczas systemy klasyfikacji kolumn chromatograficznych, ponieważ określając podobieństwa i różnice pomiędzy nimi, mogą to zadanie znacząco ułatwić. Dla analityków i klinicystów istotne jest jednak przede wszystkim potwierdzenie ich przydatności w rzeczywistych analizach farmaceutycznych i biomedycznych. To zagadnienie stało się tematem przewodnim sześciu prezentowanych prac [H1-H6], których celem było przeprowadzenie analiz porównawczych teoretycznej klasyfikacji kolumn chromatograficznych metodami QSRR i KUL z danymi uzyskanymi w trakcie realnych analiz farmaceutycznych [H1-H4] i biomedycznych [H5,H6]. Powyższe badania zostały oparte na chemometrycznej wielowymiarowej ocenie danych eksperymentalnych.

#### *Ocena przydatności systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej opartego na metodzie QSRR*

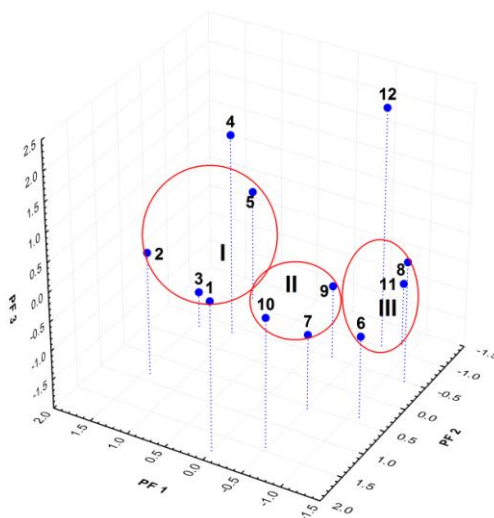
[H1] A. Plenis, L. Konieczna, N. Miękus, T. Bączek, Development of the HPLC method for simultaneous determination of lidocaine hydrochloride and tribenoside along with their impurities supported by the QSRR approach, *Chromatographia*, 76 (2013) 255-265.

Ocenę przydatności metody QSRR w rzeczywistej analizie farmaceutycznej przeprowadziłam na podstawie analizy chlorowodoru lidokainy i tribenozydu wraz z ich zanieczyszczeniami w gotowej postaci farmaceutycznej (kremie) [H1]. W tym celu opracowałam metodę jednoczesnego oznaczania obu substancji aktywnych w obecności ich zanieczyszczeń techniką HPLC, ponieważ metodyka umożliwiająca tego typu analizę chromatograficzną nie była dostępna w światowej literaturze naukowej.

Test oceniający wiarygodność metody QSRR w praktyce farmaceutycznej oparłam na analizie porównawczej charakterystyk dwunastu różnorodnych kolumn do RP-LC opartych na dwóch modelach QSRR względem danych opisujących przebieg rzeczywistych analiz farmaceutycznych zawierających wartości parametrów retencyjnych dwóch substancji leczniczych i ich pięciu zanieczyszczeń, tj. czasy retencji ( $t_R$ ) i rozdzielczości pików ( $R_s$ ), które zostały wyznaczone przy zastosowaniu wszystkich badanych fazach stacjonarnych. Powyższe dane uzupełniłam o wyniki testu SST dla chlorowodoru lidokainy i tribenozydu [68]. Do analizy porównawczej wykorzystałam analizę czynnikową (FA). Z wartości ładunków czynnikowych uzyskanych dla zbioru zawierającego charakterystyki faz stacjonarnych sporządzone metodą QSRR wynikało, że najwyższą korelację pierwszego czynnika głównego (ang. *Principal Factor*, PF1) odnotowano względem dwóch parametrów tj. hydrofobowości faz stacjonarnych, które w modelu QSRR opisano wartością współczynnika  $a_2$  oraz powierzchnią dostępną do kontaktu z rozpuszczalnikiem ( $A_{WAS}$ ), która określa siłę oddziaływań dyspersyjnych (typu Londonowskiego) analitu z molekułami faz chromatograficznych. W modelu QSRR parametr ten charakteryzowała wartość współczynnika  $a'_4$ . Tym samym, w analizie FA różnice wartości powyższych parametrów w znaczący sposób determinowały rozmieszczenie zmiennych i obiektów względem osi wyznaczonej przez PF1. Różnice polarności analitu oraz jego zdolność do udziału w polarnych oddziaływaniach opisane w modelu QSRR poprzez wyznaczenie wartości współczynnika  $a'_3$  istotnie wpływały na drugi czynnik główny (PF2). Najmniejszy wpływ odnotowano dla interakcji dipol-dipol oraz oddziaływania dipol-dipol indukowany pomiędzy analitem a fazą ruchomą i stacjonarną. Dla testowanych faz stacjonarnych były one określone wartością współczynnika  $a'_2$  występującego przy deskrytorze  $\mu$  i miały decydujący wpływ dopiero na położenie kolumn chromatograficznych na osi PF3. Wykresy rozrzutu obiektów w przestrzeni wyznaczonej przez trzy pierwsze czynniki główne przedstawia Rys. 1.

Na jego bazie mogłam wysunąć szereg istotnych wniosków, ponieważ położenie kolumn chromatograficznych jednocześnie określało skalę podobieństwa ich właściwości fizykochemicznych wyznaczoną za pomocą FA. Zatem mogłam przyjąć, że fazy stacjonarne w obrębie tego samego zgrupowania były względem siebie podobne, a odmienne w stosunku do kolumn chromatograficznych umieszczonych w innych klasterach. To oznacza, że pod względem właściwości fizykochemicznych większość kolumn chromatograficznych została przydzielona do trzech klasterów, przy czym

bardziej szczegółowy opis podobieństw i różnic pomiędzy nimi został zawarty w pracy [H1].

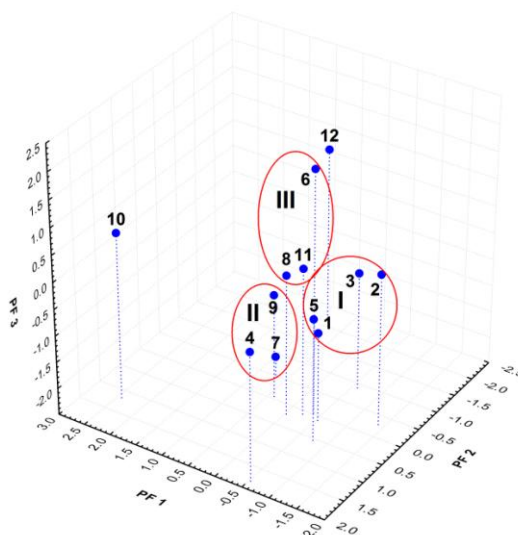


**Rys. 1.** Trójwymiarowy wykres FA dla obiektów sporządzony na podstawie wartości współczynników regresji liniowej  $a_2$ ,  $a'_2$ ,  $a'_3$ , and  $a'_4$  wyznaczonych w dwóch modelach QSRR dla dwunastu testowanych kolumn do RP-LC (na podstawie Rys. 2 b z pracy [H1]).

Wykresy rozrzutu dla obiektów w przestrzeni trójwymiarowej określonej przez FA na podstawie danych opisujących przebieg rzeczywistej analizy farmaceutycznej, tj. czasów retencji ( $t_R$ ) i rozdzielczości pików ( $R_s$ ) analitów przedstawia Rys. 2. Analiza czynnikowa dla tego zbioru została przeprowadzona z zachowaniem tej samej numeracji faz stacjonarnych, która była stosowana dla danych klasyfikacyjnych.

Należy podkreślić, że zastosowanie FA pozwoliło zredukować liczbę zmiennych do trzech czynników głównych, przy czym położenie zmiennych i obiektów na wykresie PF1-PF3 umożliwiło wyjaśnienie 75,23% całkowitej zmienności danych wyjściowych.

Biorąc pod uwagę wartości ładunków czynnikowych ustaliłam, że pierwszy czynnik główny był przede wszystkim skorelowany z  $t_R$  tribenozdydu i jego zanieczyszczeniami, a także rozdzielczością pików benzaldehydu. Tym samym, zróżnicowanie wartości wymienionych powyżej parametrów retencyjnych w największym stopniu rzutowało na położenie faz stacjonarnych względem osi PF1. W przypadku drugiego czynnika głównego zanotowałam jego wysoką korelację z parametrami opisującymi czasy retencji chlorowodoru lidokainy i 2,6-dimetyloaniliny. Wariancja zaś pozostałych parametrów retencyjnych oznaczanych związków w znaczącym stopniu decydowała o położeniu faz stacjonarnych względem osi PF3.



**Rys. 2.** Trójwymiarowy wykres FA dla obiektów sporządzony na podstawie wartości parametrów retencyjnych ( $t_R$  ad  $R_s$ ) wyznaczonych dla oznaczanych związków podczas testu farmaceutycznego opartego na analizie lidokainy chlorowodoru i tribenozydu wraz z ich zanieczyszczeniami techniką HPLC (na podstawie Rys. 3 b z pracy [H1]).

Istotne jest, że położenie kolumn chromatograficznych na Rys. 2 było w znacznym stopniu zbliżone do ich rozmieszczenia na Rys. 1. Jedynie w przypadku dwóch faz stacjonarnych (nr 4 i 10) ich charakterystyki QSRR mogły sugerować inny przebieg rozdzielania chromatograficznego.

Podsumowując, metoda QSRR właściwie charakteryzuje właściwości fizykochemiczne faz stacjonarnych i może być z powodzeniem stosowana, jako narzędzie ułatwiające wybór optymalnej kolumny chromatograficznej dla danej analizy farmaceutycznej.

#### 🚦 Ocena przydatności systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych opartego na metodzie KUL w praktyce farmaceutycznej

[H2] J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Evaluation of a column classification method using the separation of alfuzosin from its related substances, *J. Chromatogr. A*, 1229 (2012) 198-207.

[H3] J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Application of a column classification method in a selectivity study involving caffeine and its related impurities, *Talanta*, 99 (2012) 492-501.

[H4] J. Szulfer, A. Plenis, T. Bączek, Chemometric evaluation of the column classification system during the pharmaceutical analysis of lamotrigine and its related substances, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 6529-6541.



Badania dotyczące oceny przydatności metody KUL, jako systemu klasyfikującego kolumny chromatograficzne, stały się tematem przewodnim kolejnych trzech publikacji wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego [H2-H4]. Powyższą weryfikację przeprowadziłam stosując tradycyjny model polegający na korelowaniu parametru  $F$  z wynikami testu SST dla testowanych kolumn. Ponadto, w celu dokładniejszej wizualizacji różnic i podobieństw występujących pomiędzy badanymi fazami stacjonarnymi, dla których zostały określone charakterystyki metodą KUL oraz wyznaczone wartości parametrów retencyjnych oznaczanych związków w rzeczywistych analizach farmaceutycznych, zastosowałam różnorodne narzędzia chemometryczne.

W zależności od wyboru kolumny odniesienia (referencyjnej) (Inertsil OSD2 [H2], Supelcosil LC-18-DB i Kromasil 100-5 C-18 [H3] oraz Hypersil BDS C18 [H4]) wyznaczyłam wartości parametru  $F$  dla testowanych kolumn, a następnie nadałam im numery określające ich pozycję na liście rankingowej - im wyższa wartość  $F$  tym wyższy numer porządkowy kolumny chromatograficznej. Wyselekcjonowanie dwóch kolumn referencyjnych w tym samym zadaniu badawczym [H3] wynikało z faktu, iż jego celem było sprawdzenie, czy prawdopodobieństwo właściwego wyboru optymalnej fazy stacjonarnej jest porównywalne niezależnie od tego, względem jakiej kolumny referencyjnej wyznaczymy parametry  $F$ . Dotyczy to szczególnie sytuacji, gdy dysponujemy tymi samymi zbiorami charakterystyk sporządzonych metodą KUL. Numeracje faz stacjonarnych ustalone dla poszczególnych zadań badawczych były utrzymane w trakcie wszystkich analiz chemometrycznych, które dane zadanie badawcze obejmowało.

Ze względu na fakt, iż badania porównawcze oceniające wiarygodność metody KUL w praktyce farmaceutycznej opisane w pracach [H2,H3] zostały przeprowadzone dla substancji leczniczych i ich zanieczyszczeń wymagających izokratycznych warunków analizy chromatograficznej, podobnie jak w procedurze KUL, nasunęło się pytanie, czy metoda KUL może być użytecznym narzędziem ułatwiającym wybór optymalnej fazy stacjonarnej także dla analiz przebiegających z gradientowym przepływem fazy ruchomej. Uzyskanie odpowiedzi na to pytanie stało się celem badań opisanych w pracy [H4].

Pierwszy test praktycznej aplikacji w analizie farmaceutycznej polegał na oznaczaniu alfuzosyny i jej dwóch zanieczyszczeń (A i D) [H2]. W przypadku tej substancji aktywnej, farmakopealny test SST narzuca, aby stosunek piku do doliny ( $p/v$ ) wyznaczony dla zanieczyszczenia A i alfuzosyny wynosił minimum 5,0 [68].

Ocenę przydatności metody KUL w kolejnym badaniu przeprowadziłam na podstawie danych uzyskanych podczas analizy kofeiny i jej czterech zanieczyszczeń (A, C, D i F), dla której oznaczenie według farmakopealnych kryteriów testu SST powinno być wykonane z rozdzielczością pików ( $R_s$ ) zanieczyszczeń C i D oraz F i A na poziomie minimum 2,5 [H3]. Pod uwagę brałam także  $t_R$  kofeiny, który zgodnie z zaleceniami farmakopealnymi powinien wynosić ok. 8 min, ale parametr ten nie był traktowany, jako decydujący miernik jakości rozdzielenia chromatograficznego [68].

Trzeci test dotyczył oznaczania lamotryginy i jej siedmiu zanieczyszczeń (A, B, C, D, E, F i G) [H4]. Farmakopealnymi kryteriami testu SST dla tej analizy jest uzyskanie  $p/v$  minimum 1,2 dla zanieczyszczenia A i lamotryginy, podczas gdy  $t_R$  lamotryginy powinien wynosić około 7 min, a względne czasy retencji ( $t_{RR}$ ) zanieczyszczeń G, A, E i F osiągać wartość ok. 1,1; 1,3; 1,7 i 1,8 min [68]. Wszystkie te wymogi zostały uwzględnione w trakcie oceny przydatności metody KUL w praktyce farmaceutycznej.

Jak wspomniałam powyżej, do przeprowadzenia badań porównawczych teoretycznej klasyfikacji faz stacjonarnych wyznaczonej metodą KUL z danymi opisującymi przebieg rzeczywistych analiz farmaceutycznych wykorzystałam różnorodne techniki chemometryczne: PCA, CA [H2] i FA [H3,H4]. Wyniki chemometryczne jednoznacznie wykazały, że we wszystkich badaniach największą korelację pierwszego składnika (czynnika) głównego obserwowano w odniesieniu do parametru określającego aktywność silanolową, który w metodzie KUL był scharakteryzowany wartością względnego współczynnika retencji benzyloamina/fenol w pH 2,7 ( $rk_{ba/ph\ pH\ 2,7}$ ) oraz parametru  $k_{2,2'd}$ , który opisuje aktywność silanolową i stopień zanieczyszczenia metalami ciężkimi. To oznacza, że rozmieszczenie przestrzenne zmiennych i obiektów (faz stacjonarnych) względem osi określonej przez pierwszy składnik główny (ang. *Principal Component* – PC1) [H2] lub pierwszy czynnik główny (PF1) [H3,H4] na wszystkich wykresach rozrzutu bazujących na danych klasyfikacyjnych było przede wszystkim uwarunkowane różnicami w wartościach  $rk_{ba/ph\ 2,7}$  i  $k_{2,2'd}$ . W przypadku drugiego głównego składnika (czynnika) był on przede wszystkim skorelowany z parametrem opisującym hydrofobowość kolumny ( $k_{amb}$ ) oraz parametrem określającym jej selektywność przestrzenną ( $rk_{tri/ter}$ ). Podsumowując, przestrzenne rozmieszczenie zmiennych i obiektów na dwuwymiarowym wykresie PCA bądź FA pozwoliło wyjaśnić odpowiednio 72,44% [H2]; 73,07% [H3] i 78,22% [H4] całkowitej zmienności układu.

Wykres PCA sporządzony dla obiektów (faz stacjonarnych) scharakteryzowanych metodą KUL wykazał, że pod względem właściwości fizykochemicznych kolumny

chromatograficzne zostały przyporządkowane do trzech klastrów, przy czym jeden z nich podzielony na dwa podzbiory [H2]. Bardzo zbliżoną charakterystykę podobieństw i różnic właściwości fizykochemicznych testowanych faz stacjonarnych uzyskałam po zastosowaniu analizy skupień (CA). Jeżeli ocenę chemometryczną wyników klasyfikacyjnych przeprowadziłam przy użyciu FA bazującej na algorytmie *varimax* [H3] bądź wykonanej bez rotacji układu współrzędnych [H4] to efektem było przyporządkowanie wszystkich faz stacjonarnych [H3], bądź większości z nich [H4], do czterech klastrów.

Ponadto, wyniki analiz chemometrycznych potwierdziły zależność pomiędzy wartością parametru  $F$  a położeniem faz stacjonarnych na wykresach rozrzutu, chociaż odstępstwa były również obserwowane. Szczegółowy opis tych podobieństw i różnic został zawarty w omawianych publikacjach [H2-H4]. Na przykład, przy wyborze dwóch faz stacjonarnych, jako kolumn referencyjnych, chemometryczna analiza wyników klasyfikacyjnych wskazała na pełniejsze rozdzielenie faz stacjonarnych z niskimi i pośrednimi wartościami parametru  $F$  dla Kromasil 100-5 C18 niż Supelcosil LC-18 [H3]. Ponadto, z wykresów FA wyraźnie wynikało, że właściwości fizykochemiczne obu kolumn referencyjnych określone przy użyciu metody KUL były odmienne (zostały przydzielone do innych klastrów). Dane te są zgodne z charakterystyką tych kolumn dostarczoną przez producentów, którzy deklarują, że Supelcosil LC-18-DB zawiera wypełnienie krzemionkowe typu A oraz posiada w swej strukturze 11% węgla, podczas gdy Kromasil 100-5 C18 jest wyprodukowana na bazie krzemionki typu B, a jej zawartość węgla wynosi 19%.

Podobnie, jak w przypadku metody QSRR, aby przeprowadzić test weryfikacyjny określający wiarygodność klasyfikacji kolumn chromatograficznych metodą KUL w praktyce farmaceutycznej, przeprowadziłam za pomocą PCA i CA [H2] oraz FA [H3,H4] analizę danych retencyjnych, tj.  $t_R$  i  $R_s$  oznaczanych związków, które jednoznacznie opisują przebieg danej analizy chromatograficznej. W tym przypadku, niezależnie od wybranego algorytmu obliczeniowego (PCA) [H2], bądź FA [H3,H4]) przestrzenne rozmieszczenie kolumn względem osi określonej przez pierwszy główny składnik (czynnik) było przede wszystkim zależne od wartości  $t_R$  analitów [H2-H4]. Położenie zaś faz stacjonarnych na osi PC2 [H2] bądź PF2 [H3,H4]) było uwarunkowane w dużej mierze różnicami w rozdzielczości pików.

Należy podkreślić, że w każdym z prowadzonych badań [H2-H4] znacząca większość kolumn chromatograficznych została przypisana do tych samych klastrów,

które wcześniej zostały wyróżnione za pomocą klasyfikacji faz stacjonarnych metodą KUL. Szczegółowy opis podobieństw i różnic występujących pomiędzy kolumnami zakwalifikowanymi do tych samych, jak i odmiennych klastrów, z uwzględnieniem wyników testu SST, został umieszczony w pracach [H2-H4]. Podobny obraz zróżnicowania przebiegu rozdzielania chromatograficznego oznaczanych związków został określony także za pomocą CA [H2]. Korelując wykresy CA sporządzone na podstawie danych klasyfikacyjnych i parametrów retencyjnych opisujących przebieg analizy chromatograficznej wykazałam, że tylko 9 z 36 faz stacjonarnych (25,0%) znajdowało się w innych położeniach. To wskazywało, że ich charakter fizykochemiczny jest odmienny w stosunku do opisu sporządzonego za pomocą metody KUL.

Biorąc pod uwagę tradycyjny sposób weryfikacji przydatności metody KUL w praktyce farmaceutycznej polegający na korelacji parametru  $F$  z wynikami testu SST wykazałam, że we wszystkich badaniach [H2-H4] najwyższe prawdopodobieństwo prawidłowego przebiegu analizy odnotowano dla kolumn z  $F < 2$ , które później spadało wraz ze wzrostem wartości parametru  $F$ . Jednakże w przypadku oznaczania kofeiny i jej czterech zanieczyszczeń, ściślejszą korelację pomiędzy parametrem  $F$  a wynikiem testu SST odnotowałam dla Supelcosil LC-18-DB niż Kromasil 100-5 C18 [H3].

Nieco odmienny obraz wzajemnych zależności pomiędzy danymi klasyfikacyjnymi a wynikami rzeczywistych aplikacji farmaceutycznych uzyskałam porównując wyniki chemometryczne, gdyż na wykresie FA sporządzonym na podstawie charakterystyk kolumn chromatograficznych dostrzegłam wyraźniejszą separację optymalnych faz stacjonarnych, z włączeniem Kromasil 100-5 C18, względem kolumn chromatograficznych, które nie gwarantowały właściwego rozdzielania analitów, niż w przypadku tych znajdujących się w otoczeniu Supelcosil LC-18-DB.

Pomimo drobnych różnic wynikających z tradycyjnego (ogólnego) bądź chemometrycznego (szczegółowego) opisu danych eksperymentalnych, jako kryterium oceny przydatności metody KUL w praktyce farmaceutycznej wykazałam, że system klasyfikacji kolumn procedurą KUL ułatwia wybór optymalnej fazy stacjonarnej do danej analizy chromatograficznej [H2-H4]. Stwierdziłam ponadto, że wszystkie fazy stacjonarne ze złożem z wbudowanym polarnym ugrupowaniem pomiędzy nośnik a łańcuch alifatyczny (ang. *embedded*) bądź fazy z zablokowanymi aktywnymi miejscami silanolowymi na powierzchni żelu krzemionkowego (tzw. *end-capped*) oferowały optymalne warunki oznaczania alfuzosyny i jej zanieczyszczeń techniką HPLC [H2]. Istotne jest także to, iż szczególnie satysfakcjonujące rozdzielanie tej substancji czynnej

w obecności jej zanieczyszczeń z wartością testu SST znacznie przewyższającą wielkość osiąganą dla kolumny referencyjnej (Inertsil OSD2) uzyskałam dla faz stacjonarnych o opisanych powyżej złożach, które na podstawie klasyfikacji metodą KUL zostały skupione w jednym z klasterów. Zatem, procedura KUL pozwoliła wytypować fazy stacjonarne o wyższych możliwościach rozdzielczych niż sugerowana kolumna chromatograficzna z wypełnieniem krzemionkowym typu B (<http://www.edqm.eu/en/Knowledge-Database-707.html>).

W przypadku analizy kofeiny i jej zanieczyszczeń techniką HPLC wykazałam, że kolumny chromatograficzne zawierające wypełnienie krzemionkowe typu B są optymalnymi fazami stacjonarnymi do tej analizy, przy czym prawdopodobieństwo właściwego rozdzielania chromatograficznego dla tych związków spada dla kolumn ze złożami *embedded* oraz *end-capped* i obniża się jeszcze bardziej dla faz stacjonarnych z wypełnieniem krzemionkowym typu A [H3].

W odniesieniu do analiz farmaceutycznych przebiegających z gradientową elucją fazy ruchomej [H4] zdecydowana większość faz stacjonarnych (23/28 – 82,1%) została właściwie sklasyfikowanych metodą KUL. Ponadto, kolumny chromatograficzne z wypełnieniem krzemionkowym typu B w wyższym stopniu gwarantowały optymalne rozdzielanie chromatograficzne lamotryginy i jej siedmiu zanieczyszczeń, podczas gdy najmniej polecanymi do tej analizy są fazy stacjonarne zawierające złoża *embended* lub *end-capping*.

Podsumowując, system klasyfikacji kolumn oparty na metodzie KUL jest pomocnym narzędziem analitycznym ułatwiającym wybór optymalnej kolumny chromatograficznej.

#### Ocena przydatności systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce biomedycznej

[H5] A. Plenis, E. Balakowska, T. Bączek, The comparison of two column classification systems during the chromatographic analysis of steroids, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 3310-3321.

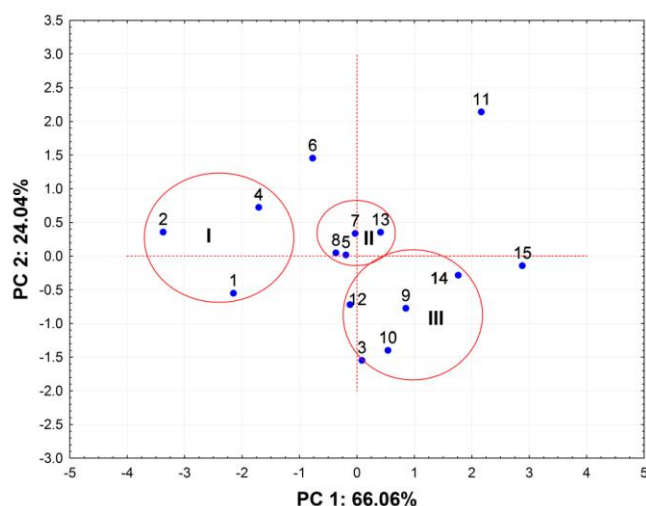
[H6] A. Plenis, I. Olędzka, T. Bączek, Classification of LC columns based on the QSRR method and selectivity toward moclobemide and its metabolites, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 78-79 (2013) 161-169.

Sprawdzenie przydatności systemu klasyfikacji kolumn chromatograficznych metodą QSRR w rzeczywistych analizach biomedycznych wykonałam w oparciu o badania dotyczące oznaczania hormonów steroidowych w moczu [H5] oraz

moklobemidu i jego dwóch metabolitów w osoczu krwi ludzkiej techniką HPLC [H6]. Ocenę wiarygodności procedury KUL oparłam na analizie hormonów steroidowych w moczu [H5]. W pierwszym teście weryfikacyjnym zastosowałam nowo opracowaną metodę HPLC z użyciem kolumny Nucleosil 100-5 C18 125 x 4 mm, 5  $\mu$ m i elucji gradientowej fazy ruchomej, która umożliwiała jednoczesną analizę jakościową i ilościową sześciu hormonów steroidowych w moczu ludzkim [H5]. W drugim badaniu [H6] wykorzystałam wcześniej opracowaną metodykę oznaczania moklobemidu i jego dwóch metabolitów w osoczu ludzkim techniką HPLC [70].

Ponadto, w ramach realizacji pierwszego zadania badawczego przeprowadziłam analizę porównawczą 15 charakterystyk kolumn chromatograficznych sporządzonych za pomocą procedury KUL i metody QSRR. W tym celu wyznaczyłam wartości parametru  $F$  względem kolumny Nucleosil 100-5 C18 i przyporządkowałam kolumnom chromatograficznym numery porządkowe zgodne z wynikami ich klasyfikacji metodą KUL. Następnie sporządziłam za pomocą PCA dwuwymiarowe wykresy rozrzutu faz stacjonarnych w oparciu o wartości współczynników regresji wyznaczonych dla modeli QSRR [H5]. Tym samym mogłam graficznie zilustrować podobieństwa i różnice właściwości fizykochemicznych badanych faz stacjonarnych określone dwoma sposobami ich klasyfikacji. Wyniki tych badań przedstawia Rys. 3.

Pod względem właściwości fizykochemicznych, większość faz stacjonarnych przyporządkowana została do trzech klasterów, przy czym ich rozmieszczenie w przestrzeni wyznaczonej przez dwa pierwsze składniki główne wyjaśniało 90,10% całkowitej zmienności danych wyjściowych. Ponadto, grupowanie się faz stacjonarnych w dużej mierze przebiegało zgodnie ze wzrastającą wartością  $F$ , co dowodzi, że systemy klasyfikacji kolumn chromatograficznych oparte na metodach QSRR i KUL porównywalnie określiły właściwości fizykochemiczne testowanych faz stacjonarnych.



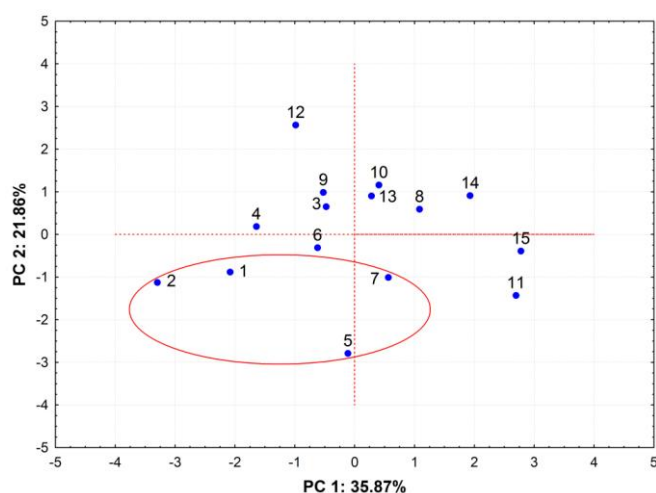
**Rys. 3.** Dwuwymiarowy wykres PCA sporządzony na podstawie współczynników regresji liniowej  $a_2$ ,  $a'_2$ ,  $a'_3$ , and  $a'_4$  wyznaczonych w modelach QSRR dla piętnastu testowanych faz stacjonarnych (na podstawie Rys. 1 z pracy [H5]).

Zgodnie z wykresem PCA sporządzonym na bazie danych klasyfikacyjnych 24 kolumn chromatograficznych uzyskanych metodą QSRR w badaniach opisanych w publikacji [H6], przyporządkowałam większość faz stacjonarnych do trzech klastrów. Wyniki te były zgodne z wynikami hierarchicznej analizy skupień (HCA).

Jednocześnie przeprowadziłam analizę porównawczą wyników klasyfikacji kolumn metodami QSRR i KUL na podstawie analizy regresji liniowej, w której dla uzyskania tej samej formy zapisu matematycznego w obu zbiorach danych, korelowałam zlogarytmowane wartości parametrów chromatograficznych wyznaczonych metodą KUL względem odpowiadającym im współczynnikom regresji wyznaczonym dla dwóch modeli QSRR [H5]. Jednakże, wyniki tych badań wykazały słabą korelację pomiędzy zlogarytmowanymi postaciami parametrów chromatograficznych wyznaczonymi metodą KUL a współczynnikami regresji liniowej określonymi metodą QSRR. Te rezultaty są zgodne z wcześniej opublikowanymi pracami, w których także odnotowano słabą korelację parametrów KUL z parametrami wyznaczonymi metodą Syndera i Dolana [24], podczas gdy istotne podobieństwa wykazano pomiędzy wartościami współczynników regresji liniowej określonymi w modelach QSRR a wartościami parametrów wyznaczonych na podstawie modelu hydrofobowo-subtraktywnego [19].

Przeprowadziłam także wizualizację różnic i podobieństw, występujących pomiędzy testowanymi fazami stacjonarnymi, wyznaczonych metodami KUL i QSRR poprzez wykonanie analizy PCA dla połączonego zbioru danych zawierającego zarówno

wartości zlogarytmowanych parametrów chromatograficznych określonych metodą KUL jak i wartości współczynników regresji uzyskanych metodą QSRR. W efekcie powstał wykres rozrzutu, na którym rozmieszczenie faz stacjonarnych różniło się względem otrzymanego wyłącznie na bazie wyników QSRR (Rys. 3), ale pomimo to lokalizacja kolumn była w znacznym stopniu skorelowana z ich pozycjami na liście rankingowej. Wyniki tych badań przedstawia Rys. 4.



**Rys. 4.** Wykres PCA dla obiektów sporządzony na podstawie wartości współczynników regresji liniowej  $a_2$ ,  $a'_2$ ,  $a'_3$ , i  $a'_4$  wyznaczonych dla modeli QSRR i zlogarytmowanych wartości parametrów chromatograficznych wyznaczonych za pomocą metody KUL dla 15 testowanych faz stacjonarnych (na podstawie Rys. 6 z pracy [H5]).

Weryfikację przydatności systemów klasyfikacji kolumn bazujących na metodzie QSRR w praktyce biomedycznej przeprowadziłam w oparciu o analogiczną metodykę badawczą do opisaną dla analiz farmaceutycznych [H1]. W przypadku metody KUL, podobnie jak wcześniej [H2-H4], korelowałam wartości parametru  $F$  z wynikami testu określającego jakość rozdzielności chromatograficznych. W analizach biomedycznych głównym kryterium dla tego testu było uzyskanie rozdzielczości pików  $R_s \geq 1,5$  dla wszystkich analitów.

Z uzyskanych danych chemometrycznych wynikało, podobnie jak w przypadku analiz farmaceutycznych [H1-H4], iż zmienność układu wynikająca z różnic w  $t_R$  oznaczanych związków w dużej mierze była wyjaśniana przez pierwszą główną składową, podczas gdy różnice w rozdzielności pików były głównie eksplorowane przez drugą główną składową [H5,H6]. Jednocześnie, graficzna prezentacja wyników PCA sporządzonych na podstawie danych opisujących przebieg oznaczeń sześciu hormonów steroidowych w moczu [H5] oraz moklobemidu wraz z jego dwoma metabolitami



w osoczu krwi ludzkiej [H6] pozwoliła wyjaśnić odpowiednio 82,91% i 78,53% całkowitej zmienności danych wyjściowych.

Porównując wykresy rozrzutu faz stacjonarnych otrzymane na bazie ich charakterystyk z wykresami PCA [H5,H6] bądź CA [H6] wykonanymi na podstawie wyników rzeczywistych analiz biomedycznych potwierdziłam, że grupowanie się kolumn chromatograficznych na tych wykresach było w dużej mierze analogiczne. To wskazuje, że testowane systemy klasyfikacji kolumn właściwie charakteryzują właściwości fizykochemiczne faz stacjonarnych. Tym samym są użytecznymi narzędziami ułatwiającymi wybór optymalnej fazy stacjonarnej do danej analizy biomedycznej. Potwierdza to także następujące zestawienie. Wykonując analizy dla moklobemidu metodą „prób i błędów” początkowe prawdopodobieństwo właściwego doboru kolumny chromatograficznej wynosiło 37,5% (9/24) [H6]. Zastosowanie metody QSRR wsparte analizą PCA pozwoliło pogrupować fazy stacjonarne, dla których prawdopodobieństwo wyboru optymalnej kolumny chromatograficznej wzrosło do 62,5% dla faz z klastra I i spadło do 0,0% dla kolumn zakwalifikowanych jako punkty odbiegające. Jeszcze większy efekt uzyskano korzystając z wyników QSRR i CA, które pozwoliły wytypować fazy stacjonarne z prawdopodobieństwem właściwego wyboru wynoszącym 66,6%.

Z analiz hormonów steroidowych w moczu [H5] wynikało, że zastosowanie metody QSRR bądź KUL zwiększyło prawdopodobieństwo optymalnego doboru fazy stacjonarnej z 33,3% (5/15) do 66,6% dla kolumn umiejscowionych w klastrze I (Rys. 3). Jednakże, jeszcze wyraźniejszy potencjał predykcyjny wykazano dla danych zawierających zarówno wyniki klasyfikacyjne metodą OSRR, jak i metodą KUL (Rys. 4). Wówczas, zastosowanie PCA dla połączonych danych umożliwiło wytypowanie 4 z 5 optymalnych faz stacjonarnych (80,0%).

Reasumując, metody QSRR i KUL są użytecznymi narzędziami ułatwiającymi wybór optymalnej fazy stacjonarnej do danej analizy biomedycznej. Należy przy tym podkreślić, że prawdopodobnie zarówno metoda QSRR jak i procedura KUL wnoszą unikatowe i niepowtarzalne względem siebie informacje do opisu właściwości fizykochemicznych faz stacjonarnych. Istnieje zatem możliwość opracowania nowego modelu QSRR, który pełniej odzwierciedli zdolności rozdzielcze kolumn chromatograficznych w rzeczywistych analizach farmaceutycznych, biomedycznych i środowiskowych.

## ***II. Zastosowanie technik chemometrycznych do optymalizacji procesów derywatywacji substancji leczniczych w próbkach środowiskowych***

- [H7] J. Kumirska, N. Migowska, M. Caban, A. Plenis, P. Stepnowski, Chemometric analysis for optimizing derivatization in gas chromatography-based procedures, *J. Chemometr.*, 25 (2011) 636-643.
- [H8] J. Kumirska, A. Plenis, P. Łukaszewicz, M. Caban, N. Migowska, A. Białk-Bielińska, M. Czerwicka, P. Stepnowski. Chemometric optimization of derivatization reactions prior to gas chromatography-mass spectrometry analysis. *J. Chromatogr. A*, 1296 (2013) 164-178.

Badania opisane w pracach [H7] i [H8] prezentowanego osiągnięcia naukowego są przykładem praktycznego zastosowania PCA i CA do wielowymiarowej oceny danych eksperymentalnych, które usprawniają etap optymalizacji procesu derywatywacji związków.

Pierwsze badanie [H7] dotyczyło opracowania warunków derywatywacji związków estrogennych: estronu, 17 $\beta$ -estradiolu, estriolu, 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu i dietylostilbestrolu przed analizą GC, dla których należało dobrać optymalne warunki konwersji chemicznej grup hydroksylowych znajdujących się w strukturze tych związków do form całkowicie zderywatyzowanych z możliwie najwyższą wydajnością tej reakcji. W początkowym etapie badań wybrano trzy odczynniki silylujące: BSTFA (*N,O*-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid) + 1% TMCS (trimetylochlorosilan)/pirydyna (1:1, *v/v*), MSTFA (*N*-metylo-*N*-(trimetylsilylo)trifluoroacetamid)/pirydyna (1:1, *v/v*) oraz TMSI (*N*-trimetylosililoimidazol), a także trzy odczynniki acylujące: PFPA (bezwodnik pentafluoropropionowy), TFAA (bezwodnik trifluorooctowy) i HFBI (heptafluorobutyryloimidazol). Efektywność tworzenia się form całkowicie upochodnionych była oceniana za pomocą stosunku pola powierzchni sygnału odpowiadającego w pełni upochodnionej formy leku do sumarycznego pola powierzchni sygnałów wszystkich pochodnych tego związku.

Już wstępne wyniki wykazały, że TMSI nie gwarantuje pełnej konwersji analitów, stąd odczynnik ten został wykluczony z dalszych badań. Wartości odpowiadające formom w pełni upochodnionym uzyskane dla badanych związków estrogennych przy użyciu pięciu pozostałych reagentów derywatywacyjnych poddałam analizie PCA. Z uzyskanych danych wynikało, że dwie pierwsze główne składowe wyjaśniają 99,97% całkowitej zmienności układu. Jednocześnie, położenie zmiennych na wykresie wyraźnie sugerowało, że efektywność działania odczynników silylujących była zbliżona (były

ulożone obok siebie), podobnie jak reagentów acylujących (stanowiły jeden klaster), ale obserwowana znacząca odległość pomiędzy nimi dowodziła zróżnicowanej efektywności tych reakcji, która była niższa dla odczynników acylujących. Wyniki te były zgodne z danymi literaturowymi [71,72].

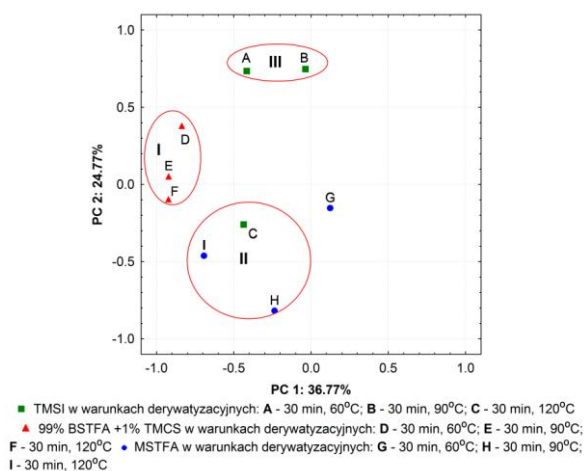
Drugi etap badań przeprowadzono z udziałem wyłącznie dwóch reagentów silylujących, przy czym BSTFA + 1% TMCS/pirydyna był testowany w zróżnicowanych warunkach temperaturowych i czasowych, a dla MSTFA/pirydyna zastosowano temperaturę 50°C i czas reakcji 30 min. Efektywność derywatywacji oceniano za pomocą parametru *RRF* (ang. *Relative Response Factor*) opisującego względne współczynniki odpowiedzi detektora dla poszczególnych pochodnych względem wzorca (2-metylo-antracenu), który nie ulegał konwersji chemicznej. Uzyskane wartości *RRF* dla badanych związków w powyższych eksperymentach poddałam analizie PCA, a rozmieszczenie obiektów i zmiennych w dwuwymiarowej przestrzeni wyznaczonej przez główne składniki pozwoliły wyjaśnić 94,13% całkowitej zmienności układu. Wyraźna separacja eksperymentu z zastosowaniem MSTFA/pirydyna względem doświadczeń z udziałem BSTFA + 1% TMCS/pirydyna wskazywała, że efektywność tego odczynnika silylującego była znacząco inna. W stosunku do czterech analitów była najwyższa, podczas gdy dla 17 $\alpha$ -etynyloestradiolu najniższa. To pozwala wnioskować, że MSTFA/pirydyna może być zastosowana do upochadniania związków estrogennych, ale konieczne są dalsze etapy optymalizacji tego procesu.

W przypadku eksperymentów związanych z zastosowaniem BSTFA + 1% TMCS/pirydyna ich umiejscowienie na wykresie PCA dowodziło, że efektywność reakcji derywatywacji była zróżnicowana. Zatem, prowadzenie reakcji derywatywacji w temperaturze  $\leq 50^{\circ}\text{C}$  bądź  $\geq 90^{\circ}\text{C}$  niezależnie od czasu jej trwania powodowało spadek wydajności. Zastosowanie zaś temperatury 60°C bądź 75°C zwiększało efektywność tego procesu, przy czym przedłużanie czasu reakcji nie skutkowało wzrostem wydajności. Dane te są zgodne z doniesieniami literaturowymi [73].

Podsumowując, optymalnymi warunkami derywatywacji związków estrogennych jest zastosowanie BSTFA z 1% dodatkiem TMCS i pirydyny (1:1, v/v), przy czym proces ten powinien być prowadzony przez 30 min w temperaturze 60°C. Interesującą alternatywą wydaje się także zastosowanie mieszaniny MSTFA i pirydyny (1:1, v/v). Należy przy tym podkreślić, że zastosowanie techniki chemometrycznej do graficznej prezentacji wyników eksperymentalnych znacząco usprawniło etap optymalizacji procesu derywatywacji związków estrogennych.

Użyteczność narzędzi chemometrycznych podczas optymalizacji procesu derywatywacji ponownie potwierdziłam w badaniach znacznie szerszej grupy leków (21), w skład której wchodziły: niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ – 8 związków),  $\beta$ -blokery (3 związki),  $\beta$ -agoniści (2 substancje), hormony o działaniu estrogenym (5 substancji) oraz leki przeciwpadaczkowe (3 związki) [H8]. Grupa tych analitów została dodatkowo powiększona o trzy substancje lecznicze o działaniu antydepresyjnym, które wprawdzie nie wymagały konwersji chemicznej do pochodnych, ale należało sprawdzić ich stabilność w trakcie reakcji derywatywacji. Analogicznie do poprzednich badań [H7], wartości parametru *RRF* wyznaczone dla pochodnych analitów były miernikiem efektywności reakcji upochadniania substancji leczniczych.

W pierwszym etapie badań zastosowano trzy odczynniki silylujące: TMSI, BSTFA + 1% TMCS i MSTFA, każdy w obecności pirydyny i octanu etylu (2:1:1, *v/v/v*), przy czym zmianie ulegała temperatura reakcji, a czas reakcji był stały (30 min) (eksperymenty A-I) [H8]. Wyznaczone wartości parametru *RRF* dla pojedynczych pochodnych bądź pochodnych charakteryzujących się najsilniejszymi sygnałami chromatograficznymi 21 związków poddałam analizie chemometrycznej za pomocą PCA. Wykres rozrzutu zmiennych, wyjaśniający 61,54% całkowitej zmienności danych wyjściowych przedstawia Rys. 5.

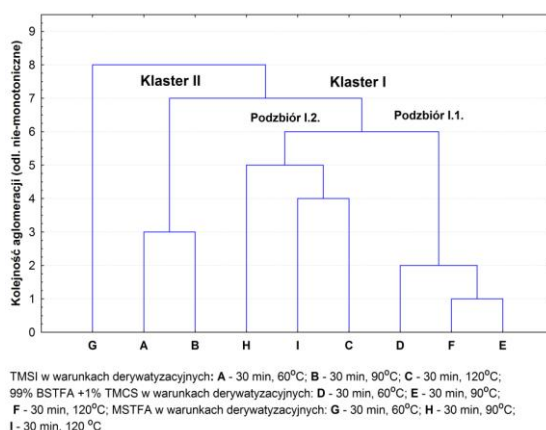


**Rys. 5.** Projekcja obiektów w przestrzeni wyznaczonej przez pierwsze dwie główne składniki (PC1-PC2) na podstawie wartości *RRF* uzyskanych dla 21 pochodnych leków w warunkach derywatywacyjnych opisanych w eksperymencie A-I (na podstawie Rys. 2 A z pracy [H8]).

Należy podkreślić, że wariancja zbioru danych opisana przez pierwszy główny składnik dotyczyła głównie zmienności BSTFA + 1% TMCS stosowanego w różnych temperaturach, podczas gdy mniejszy wpływ odnotowano względem MSTFA w 120°C.

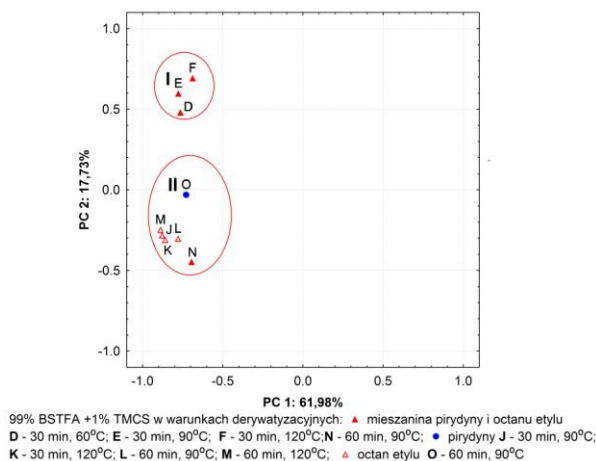
W przypadku drugiego głównego składnika najsilniejszą korelację obliczono dla TMSI w 60 i 90°C (eksperyment A i B – klaster III). Z przestrzennego rozmieszczenia zmiennych na wykresie PCA wynikało także, że TMSI stosowane w temperaturach 60 i 90°C oferowało zbliżoną (choć w tym przypadku niższą) efektywność reakcji derywatywacji względem obserwowanej w 120°C, która osiągała poziom porównywalny do uzyskiwanego przy użyciu MSTFA w 90 i 120°C (klaster II). Z drugiej strony, ich dystans do eksperymentu G sugerował, że obniżenie temperatury prowadzi do wzrostu efektywności MSTFA jako odczynnika silylującego dla większości analizowanych związków. Podsumowując, MSTFA był efektywniejszym odczynnikiem derywatywacyjnym niż TMSI, przy czym w obu przypadkach istotnym czynnikiem wpływającym na efektywność reakcji była temperatura. Niestety, ze względu na fakt, iż użycie MSTFA w 60°C nie prowadziło do konwersji chemicznej pięciu analitów, odczynnik ten nie mógł być stosowany do analizy wieloskładnikowej mieszaniny 21 substancji leczniczych.

W przypadku BSTFA + 1% TMCS takiej zależności temperaturowej, jak dla MSTFA i TMSI nie obserwowano (eksperymenty D, E, F zostały umieszczone w klasterze I). Obserwowany dystans w stosunku do pozostałych klasterów dowodził, że zastosowane warunki derywatywacji generowały odmienną (w tym przypadku wyższą) wydajność procesu deprywatyzacji niż przy użyciu MSTFA i TMSI. Dodatkowym atutem był fakt, iż wszystkie związki ulegały konwersji do pochodnych. Biorąc zaś pod uwagę stabilność analitów i pochodnych w procesie derywatywacji, której sprzyja niższa temperatura i krótszy czas reakcji na tym etapie badań ustalono, że optymalnymi warunkami derywatywacji analitów jest zastosowanie BSTFA + 1% TMCS w 60°C. Powyższe wnioski zostały w pełni potwierdzone za pomocą CA, co obrazuje diagram drzewa hierarchicznego przedstawiony na Rys. 6. Biorąc pod uwagę także odległości pomiędzy klasterami, które zostały określone na osi Y, to powyższy obraz graficzny w pełni odzwierciedla korelacje opisane za pomocą PCA.



**Rys. 6.** Wykres drzewa hierarchicznego sporządzonego na podstawie wartości *RRF* uzyskanych dla 21 pochodnych leków w warunkach derywatyzyjnych opisanych w eksperymentach A-I (na podstawie Rys. 2 B z pracy [H8]).

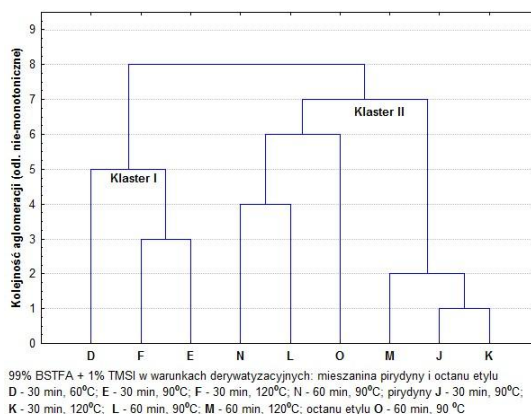
Drugi etap badań dotyczył sprawdzenia, czy możliwy jest wzrost efektywności reakcji derywatyzyjacji analitów, jeżeli zastosujemy BSTFA + 1% TMCS w połączeniu z pirydyną, octanem etylu, bądź mieszaniną tych dwóch rozpuszczalników, zmieniając przy tym temperaturę i czas reakcji (eksperymenty J-O). Do oceny danych eksperymentalnych ponownie zastosowałam PCA i CA. Wykres PCA dla zmiennych sporządzony na podstawie danych opisujących wartości *RRF* dla oznaczanych substancji leczniczych uzyskanych w trakcie wyżej wymienionych eksperymentów oraz danych otrzymanych w doświadczeniach D, E, F wyjaśniający 79,71% całkowitej zmienności danych wyjściowych przedstawia Rys. 7. Na podstawie lokalizacji zmiennych mogłam wnioskować, że porównywalną, a przy tym znacząco inną (w tym przypadku wyższą) efektywność procesu derywatyzyjacji uzyskano dla BSTFA + 1% TMCS w warunkach eksperymentów D, E i F. Doświadczenia prowadzone w obecności wyłącznie pirydyny bądź octanu etylu były mniej efektywne, a przy tym na tyle zbliżone, że zmienne te zostały umieszczone w tym samym klasterze.



**Rys. 7.** Projekcja obiektów w przestrzeni wyznaczonej przez pierwsze dwie składowe główne PC1-PC2 na podstawie wartości *RRF* uzyskanych dla 21 pochodnych leków w warunkach derywatyzyjnych opisanych w eksperymentach D-F i J-O (na podstawie Rys. 4 A z pracy [H8]).

Powyższe usytuowanie wskazuje także, że wydajność reakcji z użyciem BSTFA + 1% TMCS/pirydyna bądź BSTFA + 1% TMCS/octan etylu nie ulegała znaczącej zmianie pod wpływem przyrostu/spadku temperatury bądź w wyniku skrócenia/przedłużenia czasu jej trwania. Odmienne wnioski można wysnuć dla BSTFA + 1% TMCS w obecności mieszaniny octanu etylu i pirydyny, dla którego przedłużenie czasu reakcji spowodowało spadek efektywności tego procesu (eksperyment N).

Wyniki PCA zostały w pełni potwierdzone za pomocą CA, co ilustruje diagram drzewa hierarchicznego umieszczonego na Rys. 8.



**Rys. 8.** Wykres drzewa hierarchicznego sporządzonego na podstawie wartości *RRF* uzyskanych dla 21 pochodnych leków w warunkach derywatyzyjnych opisanych w eksperymentach D-F i J-O (na podstawie Rys. 4 B z pracy [H8]).

Zatem, wyniki analiz metodą PCA i CA, wykazały, że derywatyzyjacja mieszaniny 21 substancji leczniczych należących do pięciu różnorodnych klas farmaceutycznych

powinna być przeprowadzana przy użyciu mieszaniny: BSTFA + 1% TMCS/pirydyna/octan etylu (2:1:1, v/v/v) w temperaturze 60°C przez 30 min. Jednocześnie wykazałam, że obydwie metody chemometryczne (PCA i CA) poprzez graficzną prezentację danych pomiarowych znacząco usprawniają optymalizację warunków derywatywacji analitów [H7,H8].

### ***III. Ocena wiarygodności oznaczeń hormonów steroidowych jako biomarkerów zaburzeń psychofizycznych człowieka wsparta chemometryczną analizą danych pomiarowych***

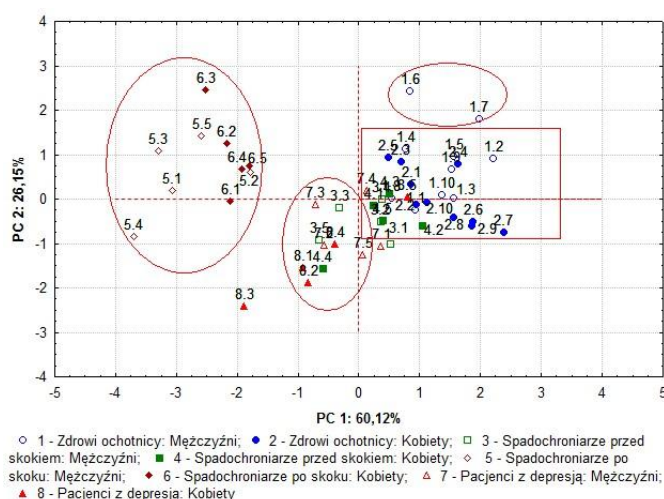
[H9] A. Plenis, L. Konieczna, I. Olędzka, P. Kowalski, T. Bączek, Simultaneous determination of urinary cortisol, cortisone and corticosterone in parachutists, depressed patients and healthy controls in view of biomedical and pharmacokinetic studies, *Mol. Biosyst.*, 7 (2011) 1487-1500.

[H10] A. Plenis\*, N. Miękus, I. Olędzka, T. Bączek, A. Lewczuk, Z. Woźniak, P. Koszałka, B. Seroczyńska, J. Skokowski, Chemometric Evaluation of Urinary Steroid Hormone Levels as Potential Biomarkers of Neuroendocrine Tumors, *Molecules*, 18 (2013) 12857–12876.

W świetle wspomnianych we wprowadzeniu różnorodnych opinii dotyczących potwierdzenia bądź wykluczenia istnienia korelacji pomiędzy sekrecją glikokorykosteroidów (głównie kortyzolu) a zaburzeniami depresyjnymi czy narażeniem na stres przeprowadziłam badania dotyczące oznaczenia wolnej frakcji kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu w moczu zdrowych ochotników, pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi oraz osób zdrowych przed i po skoku spadochronowym [H9]. Uczestnicy badań byli dopasowani pod względem wieku i wskaźnika BMI, przy czym w przeważającej większości byli ludźmi młodymi w wieku od 21 do 32 lat. Próbkę moczu były pobierane w godzinach porannych, a do oznaczenia glikokortykosteroidów zastosowałam nowo opracowaną metodę HPLC z detekcją UV. Ponadto, u wszystkich uczestników określiłam stężenie kreatyniny celem wykluczenia dysfunkcji nerek oraz przeprowadzenia względem tej substancji normalizacji stężeń hormonów steroidowych w moczu. Uzyskane dane dowiodły, że poziomy kortyzolu u zdrowych ochotników były najniższe, podczas gdy kortyzonu niższe niż u spadochroniarzy po skoku, ale wyższe niż u osób przed skokiem i u pacjentów z depresją. W przypadku kortykosteronu, jego profile były najwyższe u zdrowych ochotników. Biorąc zaś pod uwagę stosunek stężeń kortyzolu do kortyzonu były one najniższe dla zdrowych ochotników. Dane te wskazywały także, że największe dysproporcje odnotowano pomiędzy zdrowymi ochotnikami a spadochroniarzami po skoku. Aby ocenić, czy obserwowane różnice stężeń



glikokortykosteroidów były statystycznie istotne przeprowadziłam ocenę statystyczną danych za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) i testu *post-hoc* Tukey'a przy poziomie istotności  $p < 0,05$ . Powyższą ocenę wykonałam biorąc pod uwagę wyniki uzyskane wyłącznie dla kobiet bądź wyłącznie dla mężczyzn z danej grupy i korelując je z danymi określonymi dla kobiet i mężczyzn pochodzących z innych badanych grup. Uzyskane wyniki ANOVA potwierdziły, że najczęściej statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami odnotowałam w odniesieniu do stężeń kortyzolu i stosunku kortyzolu do kortyzonu, podczas gdy te różnice były mniejsze dla kortyzonu. Nie wykazałam zaś statystycznie istotnych różnic w profilach kortykosteronu. Wyniki PCA otrzymane na bazie wyznaczonych wartości stężeń glikokortykosteroidów w próbkach moczu z uwzględnieniem danych biometrycznych (BMI i wiek) uczestników badań przedstawia Rys. 9.



**Rys. 9.** Dwuwymiarowy wykres PCA sporządzony na podstawie wartości stężeń wolnej frakcji kortyzolu, kortyzonu, kortykosteronu i stosunku kortyzol do kortyzonu, a także danych biometrycznych uczestników badań (na podstawie Rys. 9 z pracy [H9]).

Graficzna prezentacja wyników pozwoliła zauważyć, że profile glikokortykosteroidów u spadochroniarzy po skoku były odmienne (w tym przypadku wyższe) niż u pozostałych uczestników badań, a przy tym na tyle porównywalne, że zostali oni zgrupowani w jednym klasterze. Widoczna separacja kobiet i mężczyzn wewnątrz tego zgrupowania pozwalała przypuszczać, że zmiana profili glikokortykosteroidów wywołana silnym czynnikiem stresogennym była przy tym zróżnicowana pod względem płci. Jednocześnie doświadczenie życiowe mogło tłumić reakcje na stres (najmłodszy mężczyzna (5.2) został ulokowany wśród kobiet).

Reasumując, wyniki badań potwierdziły znaczące zmiany poziomu glikokortykosteroidów w moczu kobiet i mężczyzn narażonych na silny czynnik stresogenny.

Ponadto, zmianę profili hormonalnych odnotowano także dla większości pacjentów z depresją, którzy na wykresie PCA utworzyli własny klaster (środkowa część wykresu), co dowodzi, że zaburzenia depresyjne, szczególnie u kobiet, także wpływają na sekrecję i metabolizm glikokortykosteroidów. Jednakże, silniejszy efekt jest obserwowany dopiero po dłuższym przebiegu choroby depresyjnej (kobieta z najdłużej potwierdzoną depresją (8.3) została ulokowana na wykresie PCA jako punkt odbiegający). Z drugiej strony, dla większości pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi obserwowane różnice były niewielkie, a ponadto osoby narażone na słaby czynnik stresogenny (spadochroniarzy przed skokiem) miały zbliżone profile glikokortykosteroidowe. To oznacza, że diagnozowanie osób z depresją na podstawie pomiaru stężeń kortyzolu i kortyzonu jest znacznie utrudnione, gdyż wystąpienie np. lekkiego stanu napięcia nerwowego może znacząco zmieniać wynik analizy. Powyższy wniosek potwierdza także grupowanie się dużej liczby zdrowych ochotników w bliskiej odległości względem pacjentów z depresją (klaster oznaczony prostokątem w środkowej i prawej części wykresu). Interesującym jest także rozdzielenie kobiet i mężczyzn w grupie zdrowych ochotników, podobnie, jak wcześniej obserwowane dla pacjentów z depresją i w grupie spadochroniarzy przed i po skoku.

Podsumowując, wyznaczane poziomy stężeń glikokortykosteroidów mogą być traktowane jako biomarkery narażenia na stres i zaburzeń depresyjnych, co potwierdziły wyniki ANOVA. Jednakże zastosowanie PCA pozwoliło określić subtelne różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi dla kobiet i mężczyzn z trzech porównywanych grup: zdrowych ochotników, pacjentów z depresją i osób narażonych na czynniki stresogenne o zróżnicowanym natężeniu. Dane PCA wskazały również, że diagnozowanie pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi na podstawie pomiaru stężeń glikokortykosteroidów może prowadzić do mylnych wniosków końcowych. Istotnym wnioskiem jest także stwierdzenie, że profile glikokortykosteroidów są zależne od płci.

Kolejnym przykładem praktycznej aplikacji metod chemometrycznych do graficznej prezentacji wyników badań związanych z oznaczaniem hormonów steroidowych w moczu, w tym przypadku, jako potencjalnych biomarkerów guzów neuroendokrynnych, są dane opisane w publikacji [H10]. W badaniach tych oznaczałam wolną frakcję endogennych poziomów kortyzolu, kortyzonu, kortykosteronu, testosteronu, epitestosteronu i progesteronu w moczu pacjentów z NET oraz zdrowych ochotników,

przy czym próbki moczu pochodziły ze zbiórki dobowej. Grupy pacjentów i zdrowych ochotników były dopasowane pod względem wskaźnika BMI i wieku. Uczestnikami badań były osoby w wieku odpowiednio  $54,6 \pm 11,8$  lata (pacjenci z NET) i  $47,3 \pm 12,5$  lata (zdrowi ochotnicy).

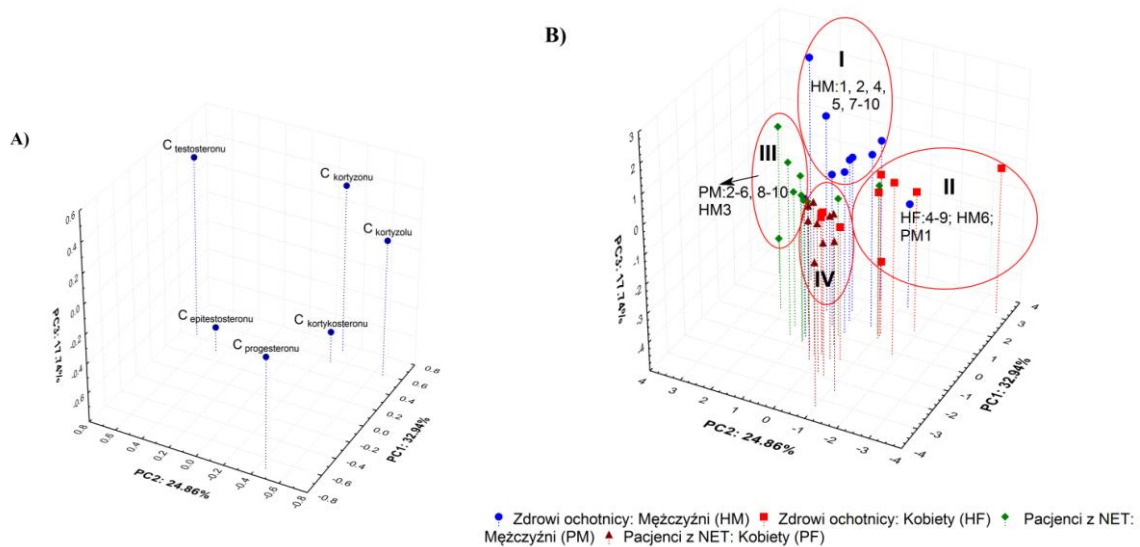
Profile sześciu hormonów steroidowych wyznaczyłam za pomocą nowo opracowanej metody HPLC z zastosowaniem kolumny Discovery HS 250 x 4 mm, 5  $\mu$ m, która w badaniach QSRR została wyselekcjonowana, jako oferująca pełniejsze rozdzielanie testosteronu, epitestosteronu i progesteronu przy jednoczesnym generowaniu wyższych sygnałów pomiarowych [H6]. Pozwoliło to skrócić czas analizy i zwiększyć czułość metody HPLC. Uzyskane wyniki wskazywały, że poziomy kortyzolu i kortyzonu było znacznie wyższe, a kortykosteronu wyższe u zdrowych ochotników niż u pacjentów z NET. W przypadku testosteronu, epitestosteronu i progesteronu wartości stężeń były zbliżone w obu grupach. Przeprowadziłam ocenę statystyczną uzyskanych danych pomiarowych z zastosowaniem parametrycznych testów (test *t*-Studenta bądź test z oddzielną analizą wariancji) i nieparametrycznego testu U Manna-Withney'a. Wybór testu był uzależniony od spełnienia warunków zastosowania danego testu statystycznego. Analiza statystyczna dotyczyła określenia różnic stężeń poszczególnych hormonów uzyskanych dla całej badanej grupy, tj. dla pacjentów z NET (P) i zdrowych ochotników (HC), jak i wyznaczonych wyłącznie dla zdrowych kobiet (HF), kobiet z NET (PF), zdrowych mężczyzn (HM) i mężczyzn z NET (PM). Jednakże najistotniejszymi pod względem znaczenia klinicznego były korelacje określone pomiędzy HM vs PM, HF vs PF oraz P vs HC, które określały ewentualny wpływ rozwoju guzów neuroendokrynych na sekrecję i metabolizm hormonów steroidowych. Wskazały one, że statystycznie istotne różnice dla wszystkich wyżej wymienionych grup uzyskałam dla kortyzolu i kortyzonu. Wprawdzie większość pacjentów z NET przyjmowała analogi somatostatyny, które zmniejszają wydzielanie hormonów nadnerczy, ale z danych literaturowych wynikało także, że skuteczność terapii analogami somatostatyny w przypadku zespołu Cushinga jest niewielka [74,75]. To zaś mogło sugerować udział innych czynników powodujących tak znaczące obniżenie poziomu kortyzolu i kortyzonu w moczu pacjentów z NET.

W przypadku kortykosteronu, obserwowane różnice stężeń były statystycznie nieistotne. Podobną sytuację, jak dla kortykosteronu, odnotowałam dla testosteronu i progesteronu, dla których wprawdzie potwierdziłam statystycznie istotne różnice stężeń u kobiet i mężczyzn, ale wynikały one raczej z przynależności do danej płci, a nie aktywności guzów neuroendokrynych. Zatem guzy neuroendokryne nie wpływają na

sekrecję i metabolizm testosteronu i progesteronu. Jedynie w przypadku epitestosteronu pojawiły się pewne wątpliwości, ponieważ wykazałam statystycznie istotne różnice pomiędzy zdrowymi ochotnikami a pacjentami z NET, także ten hormon mógłby być traktowany, jako potencjalny biomarker NET. Jednak wyniki badań dotyczące profili uzyskanych wyłącznie dla kobiet i wyłącznie dla mężczyzn z obu porównywanych grup były statystycznie nieistotne, tym samym obniżając rangę diagnostyczną pomiaru epitestosteronu jako wskaźnika rozwoju guzów neuroendokrynych.

Aby uzyskać pełniejszy obraz wzajemnych zależności pomiędzy zmiennymi, jak i przypadkami, sporządziłam wykres PCA na podstawie wyznaczonych wartości stężeń sześciu hormonów steroidowych w moczu uczestników badań, który ilustruje Rys. 10 A i B.

Przestrzenne rozmieszczenie zmiennych i obiektów w trójwymiarowej przestrzeni wyznaczonej przez pierwsze trzy składowe główne obrazuje 75,55% całkowitej zmienności danych wyjściowych. Ciekawą informację uzyskałam na podstawie umiejscowienia zmiennych na wykresie PCA (Rys. 10 A), których położenie można było w prosty sposób skorelować ze zróżnicowanymi funkcjami hormonów steroidowych w organizmie człowieka.



**Rys. 10.** Projekcja zmiennych (A) i obiektów (B) w trójwymiarowej przestrzeni utworzonej przez PCA na podstawie wyznaczonych wartości stężeń wolnej frakcji sześciu hormonów steroidowych w moczu uczestników obu badanych grup (na podstawie Rys. 4 z pracy [H10]).

Glikokortykosteroidy i androgeny zostały ulokowane po prawej stronie osi PC1, ale po przeciwnych stronach osi PC2, a jedyny przedstawiciel progestogenów - progesteron stanowił punkt odbiegający po lewej stronie osi PC1.

Kolejne cenne wnioski mogłam wysnuć na podstawie rozmieszczenia obiektów na wykresie PCA (Rys. 10 B). Wszyscy uczestnicy badań zostali bowiem przypisani do czterech klasterów, przy czym 15/20 (75,0%) zdrowych ochotników zostało umiejscowionych w dwóch klasterach (I i II), a 18/19 pacjentów z NET (94,7%) w dwóch kolejnych zgrupowaniach (III i IV). Należy przy tym podkreślić, że nie obserwowałam oddzielenia pacjentów NET, dla których zastosowano terapię analogami somatostatyny względem tych, którzy takiej terapii nie podlegali. To może potwierdzać, że prawdopodobnie rozwój guzów neuroendokrynych był przyczyną zmian profili hormonalnych, a nie terapia analogami somatostatyny. Tym bardziej, że pacjenci z NET wykazywali mniejsze zróżnicowanie stężeń hormonów steroidowych niż osoby zdrowe. Na wykresie PCA informację tę generował większy rozrzut zdrowych ochotników względem pacjentów z NET. Zatem, różnice w profilach glikokortykosteroidowych w głównej mierze decydowały o grupowaniu się zdrowych ochotników i pacjentów z NET w oddzielne klaster, podczas gdy dalsze rozdzielanie pod względem płci wynikało ze zróżnicowanych poziomów stężeń progesteronu i testosteronu, a później epitestosteronu. Istotną informacją płynącą z analizy PCA było także dostrzeżenie pełniejszej separacji zdrowych mężczyzn względem mężczyzn z NET niż kobiet z obu porównywanych grup. Oczywiście, wynika to z większych dysproporcji stężeń kortyzolu i kortyzonu u kobiet, ale z klinicznego punktu widzenia znacząco utrudnia prawidłową diagnostykę guzów neuroendokrynych na podstawie pomiarów glikokortykosteroidów.

Reasumując, oznaczenie poziomu glikokortykosteroidów, tj. kortyzolu i kortyzonu może być wskaźnikiem rozwoju guzów neuroendokrynych, szczególnie u mężczyzn, co potwierdziły wyniki oceny parametrycznej i nieparametrycznej oraz dane uzyskane na podstawie analizy głównych składowych. W przypadku kobiet prognozowanie i ocena rokownicza przebiegu zaburzeń NET są obarczone większym błędem. Należy przeprowadzić dalsze badania, które potwierdzą bądź wykluczą istnienie na tyle znaczącej korelacji pomiędzy rozwojem guzów neuroendokrynych a zmianami profili hormonalnych u kobiet i mężczyzn, które pozwolą rekomendować pomiar glikokortykosteroidów do prognozowania i oceny rokowniczej pacjentów z NET w badaniach klinicznych i biomedycznych.

## PODSUMOWANIE

Badania opisane w pracach wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego [H1-H10] dotyczyły wielowymiarowej oceny danych doświadczalnych celem usprawnienia opracowywania metod oznaczania substancji leczniczych technikami chromatograficznymi, a następnie efektywnych ich aplikacji do analizy rzeczywistych próbek farmaceutycznych, biomedycznych i środowiskowych. Przedstawiłam zatem możliwości technik chemometrycznych w zakresie efektywnej eksploracji wielowymiarowych danych eksperymentalnych, które wsparte dogłębnie rozpoznaną strukturą wzajemnych zależności występujących pomiędzy zmiennymi i obiektami badań tworzą rzetelne podstawy do przeprowadzenia wielowątkowej interpretacji uzyskanych wyników badań zarówno na etapie określania wzajemnych molekularnych oddziaływań analitu ze składnikami fazy stacjonarnej i fazy ruchomej zachodzących w trakcie przebiegu rozdzielania chromatograficznego, oddziaływań występujących na etapie derywatywacji związków chemicznych, a także ujawniających się podczas rzeczywistych analiz substancji leczniczych w próbkach farmaceutycznych, biomedycznych i środowiskowych. Tym samym znacząco ułatwiają właściwe formułowanie wniosków końcowych płynących z wykonanych doświadczeń naukowych.

W ramach realizacji zadań badawczych objętych osiągnięciem naukowym:

1. Opracowałam wielowymiarowy test weryfikacyjny oceniający przydatność systemów klasyfikacji kolumn chromatograficznych w praktyce farmaceutycznej i biomedycznej z zastosowaniem różnorodnych narzędzi chemometrycznych – analizy czynnikowej (FA), analizy głównych składowych (PCA) i analizy skupień (CA).
2. Wykonałam nowatorskie badania oceniające wiarygodność metody QSRR w praktyce farmaceutycznej. W tym celu opracowałam i zastosowałam w teście weryfikacyjnym nowo opracowaną metodę HPLC umożliwiającą jednoczesne oznaczenie chlorowodoru lidokainy i tribenozydu wraz z ich zanieczyszczeniami w jednym przebiegu chromatograficznym. Ponadto potwierdziłam, że metoda QSRR właściwie charakteryzuje właściwości fizykochemiczne faz stacjonarnych i jest narzędziem ułatwiającym wybór optymalnej kolumny chromatograficznej do danej analizy farmaceutycznej.
3. Przeprowadziłam ocenę przydatności systemu KUL w praktyce farmaceutycznej w kierunku:

- porównania tradycyjnego sposobu korelowania wartości parametru  $F$  z wynikami testu SST z nowo opracowanym wielowymiarowym testem weryfikacyjnego z użyciem różnorodnych technik chemometrycznych;
  - oceny prawdopodobieństwa sporządzenia wiarygodnej listy rankingowej faz stacjonarnych w zależności od dokonanego wyboru kolumny referencyjnej;
  - sprawdzenia, czy metoda KUL oferuje rzetelne wyniki klasyfikacyjne także dla analiz chromatograficznych przebiegających z gradientową elucją fazy ruchomej.
4. Dostrzegłam pewne rozbieżności klasyfikacyjne wynikające z zastosowania ogólnego (tradycyjnego) bądź chemometrycznego (szczegółowego) testu weryfikacyjnego. Potwierdziłam, zróżnicowane prawdopodobieństwo wyboru optymalnej kolumny chromatograficznej dla tego samego zbioru charakterystyk sporządzonych metodą KUL, które było uwarunkowane wyborem fazy odniesienia. Wykazałam, że metoda KUL właściwie klasyfikuje kolumny chromatograficzne i może ułatwiać wybór optymalnej fazy stacjonarnej do danej analizy farmaceutycznej niezależnie od sposobu elucji fazy ruchomej.
  5. Przeprowadziłam badania dotyczące oceny przydatności metody QSRR i procedury KUL w analizach biomedycznych. W tym celu opracowałam m.in. nową metodę HPLC oznaczania hormonów steroidowych w moczu techniką HPLC. Wyniki badań potwierdziły, że oba systemy klasyfikacji kolumn chromatograficznych są porównywalne i usprawniają etap doboru optymalnej fazy stacjonarnej do danej aplikacji biomedycznej. Ponadto wykazałam, że procedura KUL i metoda QSRR wnosi specyficzny zasób informacji dotyczących właściwości fizykochemicznych kolumn chromatograficznych, co pozwala przypuszczać, że istnieje możliwość udoskonalenia metodyki klasyfikowania faz stacjonarnych opartej na nowym modelu QSRR.
  6. Przeprowadziłam pionierskie badania dotyczące zastosowania technik chemometrycznych (PCA i CA) do optymalizacji procesu derywatywacji substancji leczniczych w próbkach środowiskowych. Wyniki tych badań potwierdziły, że metody projekcji i grupowania danych znacząco usprawniają dobór optymalnych warunków derywatywacji analitów, tym samym gwarantując prawidłowe przygotowanie próbki do analizy GC.
  7. Przeprowadziłam badania dotyczące oceny wiarygodności oznaczeń glikokortykosteroidów w moczu jako biomarkerów narażenia na stres i zaburzeń depresyjnych wsparte parametryczną i chemometryczną analizą danych pomiarowych.

Wykazałam, że poziomy glikokorykosteroidów ulegają zmianie pod wpływem czynników stresogennych bądź zaburzeń depresyjnych, przy czym zastosowanie PCA pozwoliło ustalić, że wyznaczanie profili hormonalnych, jako biomarkerów reakcji na stres jest wiarygodne tylko przy silnych czynnikach stresogennych, podczas gdy diagnozowanie pacjentów z zaburzeniami depresyjnymi na podstawie pomiaru stężeń glikokortykosteroidów może prowadzić do mylnych wniosków końcowych. Istotnym wnioskiem jest także stwierdzenie, że profile glikokortykosteroidów są zależne od płci.

8. Przeprowadziłam pionierskie badania dotyczące chemometrycznej oceny oznaczeń hormonów steroidowych jako biomarkerów guzów neuroendokrynych. Potwierdziłam, że poziomy kortyzolu i kortyzonu mogą być biomarkerami rozwoju guzów neuroendokrynych u mężczyzn, ale prognozowanie i ocena rokownicza przebiegu choroby u kobiet jest obarczona dużym błędem. Zalecane jest zatem przeprowadzenie dalszych badań celem potwierdzenia bądź wykluczenia możliwości rekomendowania pomiarów glikokortykosteroidów do prognozowania i oceny rokowniczej pacjentów z NET.
9. W ramach badań biomedycznych opracowałam nowe metodyki oznaczania hormonów steroidowych w moczu techniką HPLC z izokratyczną i gradientową elucją fazy ruchomej.

Reasumując, niezależnie od podjętego zadania badawczego wykazałam, że metody chemometryczne poprzez efektywną eksplorację wielowymiarowych danych eksperymentalnych mogą znacząco wzbogacić zasoby uzyskiwanych informacji o badanym zjawisku (procesie), które tworzą solidne fundamenty do prawidłowego formułowania wniosków końcowych płynących z wykonanych doświadczeń naukowych.

## **UWAGI KOŃCOWE**

Prace naukowo-badawcze, stanowiące monotematyczny cykl publikacji były finansowane w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) oraz współfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki z kierowanego przez mnie grantu nr N N405 024340.

Interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań łączący wiedzę i umiejętności specjalistów z wielu dziedzin, wymagały także współpracy z różnymi ośrodkami



badawczymi. Podczas mojej pracy badawczej związanej z realizacją badań uwzględnionych w osiągnięciu naukowym współpracowałam z dr Jarosławem Szulferem z Zakładów Farmaceutycznych Polpharmy S.A. w Starogardzie Gdańskim w zakresie badań dotyczących aplikacji metody KUL w praktyce farmaceutycznej, dr Jolantą Kumirską z Zakładu Analizy Środowiska Instytutu Ochrony Środowiska i Zdrowia Człowieka Uniwersytetu Gdańskiego (UG) w obszarze zastosowań techniki GC-MS do analizy farmaceutyków w próbkach środowiskowych, a także dr Anną Lewczuk z Kliniki Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed), Zakładem Biologii Komórki GUMed oraz Centralnym Bankiem Tkanek i Materiału Genetycznego GUMed i Zakładem Biologii Komórki Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed, która dotyczyła współpracy w zakresie przeprowadzenia badań klinicznych z udziałem zdrowych ochotników i pacjentów z guzami neuroendokrynnymi.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] S. Wold, Chemometrics; what do we mean with it, and what do we want from it? *Chem. Intell. Lab. Syst.*, 30 (1995) 109-115.
- [2] J. Mazerski, Podstawy chemometrii, Wydawnictwo Politechniki Gdańskiej, 2000.
- [3] D. Child, The essentials of factor analysis, second edition. London: Cassel Educational Limited, 1990.
- [4] I.T. Jolliffe, Principal Component Analysis (2nd ed). Springer-Verlag New York Inc: New York, 2002.
- [5] G.D. Garson, Cluster analysis, Asheboro, NC Statistical Associates Publishers, 2012
- [6] H.A. Claessens, Trends and progress in the characterization of stationary phases for reversed-phase liquid chromatography, *Trends Anal. Chem.*, 20 (2001) 563-583.
- [7] U.D. Neue, Stationary phase characterization and method development, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 1611-1627.
- [8] L.R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr, A new look at the selectivity of RPC columns, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3255-3262.
- [9] R.W. Taft, M.J. Kamlet, The solvatochromic comparison method. 2. The  $\alpha$ -scale of solvent hydrogen-bond donor (HBD) acidities, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 2886.
- [10] K. Kimata, K. Iwaguchi, S. Onishi, K. Jinno, R. Eksteen, K. Hosoya, M. Araki, N. Tanaka, Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase, *J. Chromatogr. Sci.*, 27 (1989) 721-728.
- [11] H. Engelhardt, M. Jungheim, Comparison and characterization of reversed phases, *Chromatographia*, 29 (1990) 59-68.
- [12] M.R. Euerby, P. Petterson, A classification of commercially available RPLC columns - a tool for rational selection, *LC-GC Europe*, 13 (2000) 665-677.

- [13] L.R. Snyder, J.W. Dolan, P.W. Carr, The hydrophobic-subtraction model of reversed-phase column selectivity, *J. Chromatogr. A*, 1060 (2004) 77-116.
- [14] H.A. Claessens, M.A. van Straten, C.A. Cramers, M. Jezierska, B. Buszewski, Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 826 (1998) 135-156.
- [15] E. Van Gysegheem, M. Jimidar, R. Sneyers, M. De Smet, E. Verhoeven, Y. Vander Heyden, Stationary phases in the screening of drug/impurity profiles and in their separation method development: identification of columns with different and similar selectivities, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 751-760.
- [16] R. Kaliszan. Quantitative Structure-Chromatographic Retention Relationships. Wiley-Interscience, New York, NY, 1987
- [17] T. Bączek, R. Kaliszan, Combination of linear solvent strength model and quantitative structure-retention relationships as a comprehensive procedure of approximate prediction of retention in gradient liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 962 (2002) 41-55.
- [18] T. Bączek, R. Kaliszan, Predictive approaches to gradient retention based on analyte structural descriptors from calculation chemistry, *J. Chromatogr. A*, 987 (2003) 29-37.
- [19] T. Bączek, R. Kaliszan, K. Novotná, P. Jandera, Comparative characteristics of HPLC columns based on quantitative structure-retention relationships (QSRR) and hydrophobic-subtraction model, *J. Chromatogr. A*, 1075 (2005) 109-115.
- [20] R. Kaliszan, Quantitative Structure-(Chromatographic) Retention Relationships, *Chem. Rev.*, 107 (2007) 3212-3246.
- [21] T. Iványi, Y. Vander Heyden, D. Visky, P. Baten, J. De Beer, I. Lázár, D.L. Massart, E. Roets, J. Hoogmartens, Minimal number of chromatographic test parameters for the characterisation of reversed-phase liquid chromatographic stationary phases, *J. Chromatogr. A*, 954 (2002) 99-114.
- [22] P. Dehouck, D. Visky, G. Van den Bergh, E. Haghedooren, E. Adams, A. Kerner, Y. Vander Heyden, D.L. Massart, Z. Kovács, B. Noszál, J. Hoogmartens, Facilitated column ranking and selection in reversed-phase liquid chromatographic analysis, *LC-GC Europe*, 17 (2004) 592-601.
- [23] E. Haghedooren, A. Kerner, B. Noszál, J. Hoogmartens, E. Adams, Application of an improved column characterisation system to evaluate the within and between batch variability, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 (2007) 634-639.
- [24] S. Dragovic, E. Haghedooren, T. Nemeth, I.M. Palabiyik, J. Hoogmartens, E. Adams, Evaluation of two approaches to characterise liquid chromatographic columns using pharmaceutical separations, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3210-3216.
- [25] T. Németh, E. Haghedooren, B. Noszál, J. Hoogmartens, E. Adams, Three methods to characterize reversed phase liquid chromatographic columns applied to pharmaceutical separations, *J. Chemometrics*, 22 (2008) 178-185.
- [26] P. Dehouck, D. Visky, Y. Vander Heyden, E. Adams, Z. Kovács, B. Noszál, D.L. Massart, J. Hoogmartens, Characterisation of reversed-phase liquid chromatographic columns by chromatographic tests. Comparing column classification based on chromatographic parameters and column performance for the separation of acetylsalicylic acid and related compounds, *J. Chromatogr. A*, 1025 (2004) 189-200.

- [27] D. Visky, E. Haghedooren, P. Dehouck, Z. Kovács, K. Kóczyán, B. Noszál, J. Hoogmartens, E. Adams, Facilitated column selection in pharmaceutical analyses using a simple column classification system, *J. Chromatogr. A*, 1101 (2006) 103-114.
- [28] E. Haghedooren, J. Diana, B. Noszál, J. Hoogmartens, E. Adams, Classification of reversed-phase columns based on their selectivity towards vancomycin compounds, *Talanta*, 71 (2007) 31-37.
- [29] K. Kóczyán, E. Haghedooren, S. Dragovic, B. Noszál, J. Hoogmartens, E. Adams, Column selection for pharmaceutical analyses based on a column classification using four test parameters, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 44 (2007) 894-905.
- [30] R.J.M. Vervoort, M.W.J. Derksen, A.J.J. Debets, Monitoring of new silica-based reversed-phase stationary phases for the liquid chromatographic analysis of basic pharmaceuticals using principal components analysis, *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 157-168.
- [31] M.R. Euerby, P. Petersson, Chromatographic classification and comparison of commercially available reversed phase liquid chromatographic columns containing polar embedded groups/amino endcappings using principal component analysis, *J. Chromatogr. A*, 1088 (2005) 1-15.
- [32] C. West, E. Lesellier, Chemometric methods to classify stationary phases for achiral packed column supercritical fluid chromatography: classification of columns for achiral SFC, *J. Chemometr.*, 26 (2012) 52-65.
- [33] R. Kaliszan, T. Bączek, A. Buciński, B. Buszewski, M. Sztupecka, Prediction of gradient retention from the linear solvent strength (LSS) model, quantitative structure-retention relationships (QSRR) and artificial neural networks (ANN), *J. Sep. Sci.*, 26 (2003) 271-282.
- [34] R.E. Ardrey, R. Ardrey, *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction*, London, John Wiley, 2003.
- [35] J. Wiley. M. S Lee, E.H. Kerns, LC/MS applications in drug development, *Mass Spectrom. Rev.*, 18 (1999) 187-279.
- [36] F. Orata, in: M.A. Mohd (Ed), *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, InTech, Rijeka, 2012, 83-108.
- [37] K. Blau, A. Darbre, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, 2nd ed., Wiley, New York, 1993.
- [38] V. Zaikin, J.M. Halket, *A Handbook of Derivatives for Mass Spectrometry*, IMPublications LLP, Chichester, 2009.
- [39] M. Preu, D. Guyot, M. Petz, Development of a gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of aminoglycoside antibiotics using experimental design for the optimisation of the derivatisation reactions, *J. Chromatogr. A*, 818 (1998) 95-108.
- [40] M. Preu, M. Petz, Development and optimisation of a new derivatisation procedure for gas chromatographic–mass spectrometric analysis of dihydrostreptomycin. Comparison of multivariate and step-by-step optimization procedures, *J. Chromatogr. A*, 840 (1999) 81-91.
- [41] A. Ranz, E. Lankmayr, Screening and optimization of the derivatization of polar herbicides with trimethylanilinium hydroxide for GC-MS analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 69 (2006) 3-14.
- [42] M. Matherny, V. Balgava, J. Einax, Chemometric Evaluation of Analytica and Data Concerning Chemoecology of City Agglomeration, *Chem. Papers* 48 (1994) 95-99.
- [43] E. Cleve, E. Bach, E. Schollmeyer, Using chemometric methods and NIR spectrophotometry in the textile industry, *Anal. Chim. Acta*, 420 (2000) 163-167.

- [44] C.F. Gromboni, R. Carapelli, E.R. Pereira-Filho, A.R.A. Nogueira, Evaluation of Different Sample Preparation Procedures Using Chemometrics: Comparison Among Photo-Fenton Reaction, Microwave Irradiation, and Direct Determination of Minerals in Fruit Juices, *Food Anal. Methods*, 3 (2010) 98-103.
- [45] F.S. Greenspan, D.G. Gardnem, Endokrynologia ogólna i kliniczna, Wydawnictwo Czelej, Lublin, 2004.
- [46] J.P. Neary, L. Malbon, D.C. McKenzie, Relationship between serum, saliva and urinary cortisol and its implication during recovery from training, *J. Sci. Med. Sport*, 5 (2002) 108-114.
- [47] A. Salvador, F. Suay, E. González-Bono, M.A. Serrano, Anticipatory cortisol, testosterone and psychological responses to judo competition in young men. *Psychoneuroendocrinology*, 28 (2003) 364-375.
- [48] E. González-Bono, A. Salvador, M.A. Serrano, J. Ricarte, Testosterone, cortisol and mood in a sports team competition, *Horm. Behav.*, 35 (1999) 55-62.
- [49] B. Weeber, S. Lewicka, M. Deuschle, M. Colla, P. Vecsei, I. Heuser, Increased diurnal plasma concentrations of cortisone in depressed patients, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 85 (2000) 1133-1136.
- [50] V. Poór, S. Juricskay, A. Gáti, P. Osváth and T. Tényi, Urinary steroid metabolites and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in patients with unipolar recurrent major depression, *J. Affect. Disord.*, 81 (2004) 55-59.
- [51] P.W. Raven, N.F. Taylor, 11 $\beta$ -HSD and 17 $\beta$ -HSD as biological markers of depression: Sex differences and correlation with symptom severity, *Endocr. Res.*, 24 (1998) 659-662.
- [52] B. Römer, S. Lewicka, D. Kopf, F. Lederbogen, B. Hamann, M. Gilles, C. Schilling, V. Onken, P. Frankhauser and M. Deuschle, Cortisol Metabolism in Depressed Patients and Healthy Controls, *Neuroendocrinology*, 90 (2009) 301-306.
- [53] L. Konieczna, A. Plenis, I. Ołędzka, P. Kowalski, T. Bączek, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 33 (2010) 1613-1629.
- [54] K. Günter, Tumour biology and histopathology of neuroendocrine tumours, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21 (2007) 15-31.
- [55] E.D. Duerr, Molecular genetics of neuroendocrine tumors, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 21 (2007) 1-14.
- [56] K. Oberg, O. Casanovas, J.P. Castaño, D. Chung, G. Delle Fave, P. Denèfle, P. Harris, M.S. Khan, M.H. Kulke, A. Scarpa, Molecular pathogenesis of neuroendocrine tumors: Implications for current and future therapeutic approaches, *Clin. Cancer Res.*, 19 (2013) 2842-2849.
- [57] R.J. Hicks, Use of molecular targeted agents for the diagnosis, staging and therapy of neuroendocrine malignancy, *Cancer Imaging*, 10 (2010) S83-S91.
- [58] E. Bajetta, L. Ferrari, A. Martinetti, L. Celio, G. Procopio, S. Artale, N. Zilembo, M. di Bartolomeo, E. Seregni, E. Bombardieri, Chromogranin A, neuron specific enolase, carcinoembryonic antigen, and hydroxyindole acetic acid evaluation in patients with neuroendocrine tumors, *Cancer*, 86 (1999) 858-865.
- [59] F. Braga, S. Ferraro, R. Mozzi, A. Dolci, M. Panteghini, Biological variation of neuroendocrine tumor markers chromogranin A and neuron-specific enolase, *Clin. Biochem.*, 46 (2013) 148-151.

- [60] S. Nomura, M. Fujitaka, N. Sakura, Circadian rhythms in plasma cortisone and cortisol and the cortisone/cortisol ratio, *Clin. Chim. Acta*, 266 (1997) 83-91.
- [61] M.M. Kushnir, T. Naessen, D. Kirilovas, A. Chaika, J. Nosenko, I. Mogilevkina, A.L. Rockwood, K. Carlström, J. Bergquist, Steroid profiles in ovarian follicular fluid from regularly menstruating women and from women after ovarian stimulation, *Clin. Chem.*, 55 (2009) 519-526.
- [62] M. Palermo, C.H. Shackleton, F. Mantero, P.M. Stewart, Urinary free cortisone and the assessment of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in man, *Clin. Endocrinol., (Oxf)*. 45 (1996) 605-611.
- [63] R. Izquierdo-Hornillos, R. Gonzalo-Lumbreras, A. Santos-Montes, Method development for cortisol and cortisone by micellar liquid chromatography using sodium dodecyl sulphate: application to urine samples of rugby players. *J. Chromatogr. Sci.*, 43 (2005) 235-240.
- [64] I. Olędzka, A. Plenis, L. Konieczna, P. Kowalski, T. Bączek, Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies, *Electrophoresis*, 31 (2010) 2356-2364.
- [65] R. Gatti, E. Cappellin, B. Zecchin, G. Antonelli, P. Spinella, F. Mantero, E.F. de Palo, Urinary high performance reverse phase chromatography cortisol and cortisone analyses before and at the end of a race in elite cyclists, *J. Chromatogr. B*, 824 (2005) 51-56. Corrected and republished in: *J. Chromatogr. B* 829, 2005, 154–159.
- [66] H. Horie, T. Kidowaki, Y. Koyama, T. Endo, K. Homma, A. Kambegawa, N. Aoki, Specificity assessment of immunoassay kits for determination of urinary free cortisol concentrations, *Clin. Chim. Acta*, 378 (2007) 66-70.
- [67] A.H. Garde, A.M. Hansen, T.B. Nikolajsen, An inter-laboratory comparison for determination of cortisol in saliva. *Accred. Qual. Assur.*, 8 (2003) 16-20.
- [68] European Pharmacopoeia, Council of Europe, Strasbourg, France, 7th ed., 2011.
- [69] United States Pharmacopoeia 34, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, Maryland, USA, 2011.
- [70] A. Plenis, A. Chmielewska, L. Konieczna, H. Lamparczyk, A validated high-performance liquid chromatographic method for the determination of moclobemide and its two metabolites in human plasma and application to pharmacokinetic studies, *Biomed. Chromatogr.*, 21 (2007) 958-966.
- [71] H.B. Lee, T.E. Peart, Determination of 17b-estradiol and its metabolites in sewage effluent by solid-phase extraction and gas chromatography/mass spectrometry, *J. AOAC Int.*, 81 (1998) 1209-1216.
- [72] T. Isobe, H. Shiraishi, M. Yasuda, A. Shinoda, H. Suzuki, M. Morita, Determination of estrogens and their conjugates in water using solid-phase extraction followed by liquid-chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 984 (2003) 195-202.
- [73] K. Zhang, Y. Zuo, Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17a-ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, *Anal. Chim. Acta*, 554 (2005) 190-196.
- [74] J. Van Der Hoek, S.W. Lamberts, L.J. Hofland, The role of somatostatin analogs in Cushing's disease, *Pituitary* 7 (2004) 257-264.
- [75] L.J. Hofland, Somatostatin and somatostatin receptors in Cushing's disease, *Mol. Cell. Endocrinol.*, 286 (2008) 199-205.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### 5.1. Przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Początki mojej działalności naukowej sięgają 1991 roku, gdy jako studentka kierunku chemia na Wydziale Matematyczno-Fizyczno-Chemicznym Uniwersytetu Gdańskiego wykonałam i obroniłam pracę magisterską pod kierunkiem prof. Janusza Szafranka na temat: „Kompleksowe metody zwalczania szkodliwych gatunków owadów”. We wrześniu 1997 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny). W ramach swojej działalności naukowej realizowałam szereg projektów dotyczących badań biodostępności i biorównoważności preparatów farmaceutycznych zawierających m.in. imipraminy chlorowodorek, metoklopramidu chlorowodorek, ciprofloksacyny chlorowodorek, glibenklamid, hydrochlorotiazyd, dikofenak potasu i gemfibrozil. Powyższe badania były prowadzone we współpracy z prof. med. Marianem Smoczyńskim (Klinika Gastroenterologii i Hepatologii AMG), dr hab. Walentym Nyką (obecnie prof. n. med.) z Kliniki Neurologii Dorosłych Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) oraz dr med. Jarosławem Kornowskim (Szpital dla Nerwowo i Psychicznie Chorych w Starogardzie Gdańskim), a także we współpracy z Zakładami Farmaceutycznymi Polpharma S.A. w Starogardzie Gdańskim, Biovena Pharma Sp. z o.o. w Warszawie i Polfa Warszawa w Warszawie. Uczestniczyłam w opracowaniu metod chromatograficznych oznaczania wyżej wymienionych substancji czynnych w materiale biologicznym (osocze, surowica) z zastosowaniem różnorodnych sposobów ich detekcji, a następnie ich aplikacji do określenia profili farmakokinetycznych wybranych substancji aktywnych u ludzi po podaniu leku. Wyniki tych badań zostały opublikowane w artykule pełnotestowym [P30]<sup>1</sup> oraz były tematem dwunastu komunikatów naukowych przedstawionych na sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym w latach 2000-2003 [K76-K88,K94].

Istotnym projektem było oznaczanie moklobemidu i jego dwóch metabolitów w osoczu krwi ludzkiej techniką HPLC oraz jej zastosowanie w badaniach farmakokinetycznych. Wyznaczyłam optymalne warunki ekstrakcji oznaczanych

---

<sup>1</sup> jako [P] oznaczono publikacje naukowe z pkt. II.A, II.B Załącznik 4; jako [K] oznaczono komunikaty naukowe (postery i doniesienia ustne) z pkt. III.B Załącznik 4

związków z matrycy biologicznej w układzie ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*, LLE) oraz określiłam optymalne warunki ich rozdzielania chromatograficznego. W oparciu o opracowaną metodę HPLC wyznaczyłam profile farmakokinetyczne moklobemidu i jego dwóch metabolitów o symbolach Ro 12-8095 i Ro 12-5637 w osoczu krwi zdrowych ochotników po jednorazowym podaniu dawki leku. Na podstawie uzyskanych profili farmakokinetycznych przeprowadziłam ocenę biodostępności i biorównoważności dwóch preparatów farmaceutycznych zawierających tę samą dawkę leku. Wykazałam, że biorównoważność preparatów moklobemidu może być wyznaczona na podstawie pomiaru stężeń Ro 12-8095, który jest głównym metabolitem tej substancji czynnej w osoczu krwi ludzkiej. Ponadto, wykazałam, że profile farmakokinetyczne moklobemidu i jego metabolitów u kobiet i mężczyzn są zróżnicowane, co mogło dowodzić, że farmakokinetyka tego leku jest zależna od płci. Wyniki powyższych badań zawarłam w rozprawie doktorskiej zatytułowanej „*Opracowanie metody oznaczania moklobemidu i jego dwóch metabolitów w osoczu krwi ludzkiej oraz jej zastosowanie w badaniach farmakokinetycznych*”, której promotorem był prof. dr hab. Henryk Lamparczyk, a którą obroniłam w 2004 roku. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w dwóch komunikatach zjazdowych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych [K76,K77] oraz w artykule pełnotestowym [P25] i dwóch komunikatach naukowych [K22,K93], które ukazały się po uzyskaniu tytułu doktora nauk farmaceutycznych.

## **5.2. Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Tematyka moich badań po doktoracie w głównej mierze dotyczyła zastosowania HPLC w analizie substancji leczniczych i ich metabolitów w próbkach biologicznych (surowica, osocze, mocz, tkanki) oraz leków i ich zanieczyszczeń w próbkach farmaceutycznych. Uczestniczyłam w badaniach związanych z optymalizacją procesów ekstrakcji różnorodnych analitów z podłoża biologicznego bądź farmaceutycznego, w których stosowano zarówno technikę LLE jak i ekstrakcję do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction*, SPE). W trakcie optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego do monitorowania analitów stosowałam różnorodne sposoby ich detekcji: UV-Vis, fluorescencyjną i elektrochemiczną. Wyniki tych badań dowiodły, że interesującą alternatywą dla związków chemicznych zawierających grupy funkcyjne, które mogą ulec elektrochemicznej reakcji utleniania bądź redukcji jest zastosowanie

detekcji elektrochemicznej [P21,P26-P28,K25,K26,K54,K61,K70,K72]. Ważnym etapem prowadzonych projektów było zastosowanie opracowanych metod chromatograficznych do analiz wybranych substancji w rzeczywistych próbkach biologicznych i/bądź farmaceutycznych. Badania kliniczne były wykonywane we współpracy z dr med. Jarosławem Kornowskim oraz przy udziale Zakładów Farmaceutycznych Polpharma S.A. w Starogardzie Gdańskim, a także firmy Adamed Sp. z o.o. w Warszawie. Inne projekty dotyczyły tematyki badań statutowych prowadzonych w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed). Wyniki tych badań zostały opublikowane w 8 artykułach pełnotekstowych dotyczących metod oznaczania loratadyny [P17], feksofenadyny [P18], propafenonu [P21], chlorowodoru cetyryzyny [P24], pentoksyfiliny [P26], diklofenaku potasu [27] i florfenikolu [P29] oraz innych leków [P28] techniką HPLC w próbach biologicznych oraz były prezentowane w doniesieniach zjazdowych na sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowych [K15,K19,K24-K26,K30,K32,K38,K40,K47,K53-K57,K63,K67-73].

Kierunkiem moich zainteresowań naukowych była również ocena wpływu płci na farmakokinetkę leków o różnorodnym mechanizmie ich działania [K21,K22,K33,K58,K62,K64]. Równolegle współrealizowałam projekty dotyczące określania profili hormonów steroidowych (kortyzolu, kortyzonu i kortykosteronu, testosteronu, epitestosteronu i progesteronu) w próbkach biologicznych jako biomarkerów różnorodnych zaburzeń zdrowotnych, w tym depresji czy też reakcji na stres o zróżnicowanym nasileniu lub jako wskaźników stosowania dopingu u sportowców, które zostały opublikowane w dwóch artykułach pełnotekstowych [P16,P22] oraz dziesięciu komunikatach naukowych [K12,K20,K27,K31,K36,K39,K42-K44,K65]. Tematem jednego z projektów było oznaczanie 1-hydroksypirenu w moczu techniką HPLC jako wskaźnika narażenia na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) wynikające z palenia papierosów [P32,K34].

W tym okresie opublikowałam dwie prace przeglądowe poświęcone analizie leków przeciwdepresyjnych w próbkach biologicznych z zastosowaniem różnorodnych technik separacyjnych [P15] oraz oznaczaniu hormonów steroidowych w ślinie jako biomarkerów różnorodnych zaburzeń zdrowotnych i wskaźników nadużywania substancji dopingujących u sportowców [P19].

W obszarze moich zainteresowań naukowych znalazły się także techniki elektromigracyjne. Uczestniczyłam w wielu projektach dotyczących zastosowania



elektroforezy kapilarnej (ang. *Capillary Electrophoresis*, CE), elektrokinetycznej micelarnej chromatografii kapilarnej (ang. *Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis*, MEKC) oraz elektroforezy żelowej jedno- i dwukierunkowej (ang. *One- and Two Dimensional Gel Electrophoresis*, 1D-PAGE, 2D-PAGE) do analizy leków, jak i innych substancji egzo- i endogennych o zróżnicowanej budowie chemicznej w próbkach farmaceutycznych, biologicznych (osocze, surowica, mocz) oraz tkankach jadalnych zwierząt hodowlanych. W ramach współrealizacji tych projektów wykazałam m.in. że techniki elektromigracyjne umożliwiają szybkie i efektywne rozdzielanie chinolonów [P23,K59,K66], chinolonów i sulfonamidów [K18], fenikoli [P33,P34,K35,K92] oraz mieszaniny fenikoli z sulfonamidami [P14,K48], a także innych leków [K14,K37,K45] w próbkach pochodzenia zwierzęcego. Nieco odmienną aplikacją techniki CE było jej zastosowanie do oznaczania wybranych kationów metali oraz innych składników mineralnych w produktach spożywczych i leczniczych [P31,K11,K90], a także leków w preparatach farmaceutycznych [K50,K51]. Wyniki badań także potwierdziły, że CE jest efektywnym narzędziem analitycznym do oznaczania białek [K41,K60], witamin i aminokwasów [K3,K8]. Efektem prowadzonych projektów było również udowodnienie, że technika MEKC może być z powodzeniem stosowana do wyznaczania profili hormonów steroidowych w próbkach moczu, z tym że w tym przypadku do osiągnięcia porównywalnej do metod HPLC detekcji analitów konieczne było użycie większej objętości próbki. Z drugiej strony, jej atutem był krótszy czas analizy [P13,P20,K1,K13,K14,K23,K29]. Przeprowadziłam także badania porównawcze oceniające efektywność technik CE i HPLC w analizie leków [K28,K56]. Wykazałam m.in. że zastosowanie CE generowało wyższą czułość analiz chlorowodoru cetyryzyny [P24,K68] i florfenikolu [P29,K74,K75] w osoczu krwi niż techniką HPLC. Wkrótce zostanie również opublikowany artykuł pełnotestowy na temat oznaczania pozostałości linkomycyny i klindomycyny w tkankach zwierzęcych techniką CE [P11]. Ponadto, w roku 2013 współredagowałam i opublikowałam pracę przeglądową dotyczącą zastosowania technik elektromigracyjnych w analizie alkaloidów [P12].

Podjęłam także aktywność naukową w zakresie analiz metabolomicznych i proteomicznych, które wymagają zastosowania nowoczesnych technik separacyjnych oraz zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych. Realizowałam dwa projekty badań własnych finansowane przez Gdański Uniwersytet Medyczny dotyczący zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej w metabolomice oraz opracowania protokołu badań techniką HPLC z gradientem pH podczas rozdzielania peptydów proteomu

komórek HeLa, w których pełniłam funkcję kierownika. Uczestniczyłam również w realizacji projektu badań własnych finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego związanego z usprawnieniem rozdzieleń peptydów w proteomice z wykorzystaniem HPLC z gradientem pH (wykonawca główny). Obecnie pełnię funkcję kierownika badań nt. „*Porównawcza analiza proteomiczna hormonalnie czynnych guzów neuroendokrynych wspomagane analizą QSRR*”, które są finansowane przez Narodowe Centrum Nauki. Efektem realizacji tego projektu badawczego, poza publikacją włączoną do osiągnięcia naukowego [H10], było także zoptymalizowanie parametrów analizy proteomicznej guzów neuroendokrynych techniką elektroforezy żelowej jedno- i dwukierunkowej [K6] oraz wykonanie analiz LC-MS/MS, które pozwoliły wytypować struktury białkowe o potencjalnym znaczeniu diagnostyczno-rokowniczym w terapii pacjentów z guzami neuroendokrynymi [K5]. Wyniki powyższych badań są tematem pracy wysłanej do recenzji. Obecnie kontynuuję prace związane z wyjaśnieniem mechanizmów zależności pomiędzy rozwojem guzów neuroendokrynych a sekrecją hormonów steroidowych przy jednoczesnej ocenie diagnostyczno-rokowniczych możliwości ich zastosowania w terapii pacjentów z guzami neuroendokrynymi. Badania te są prowadzone we współpracy z Kliniką Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych GUMed. Jest to kierunek badań, który planuję kontynuować w trakcie swojej aktywności naukowej.

Równoległym kierunkiem moich badań jest także ocena właściwości fizykochemicznych faz stacjonarnych do RP-LC za pomocą systemów ich klasyfikacji. Poza publikacjami naukowymi, które zostały włączone do osiągnięcia naukowego [H1-H6] opublikowałam także 6 komunikatów naukowych prezentujących ocenę przydatności systemów klasyfikacji faz stacjonarnych opartych na metodzie KUL i modelach QSRR w praktyce farmaceutycznej i klinicznej [K2,K4,K7,K9,K17,K89]. Planuję we współpracy z dr hab. Tomaszem Bączkiem, prof. nadzw. GUMed podjąć badania związane z opracowaniem nowego modelu QSRR o wyższym potencjale predykcyjnym, niż wcześniej opracowane modele QSRR.

Ponadto, jestem współautorem skryptu elektronicznego dla studentów III roku kierunku farmacja poruszającego tematykę chemicznych metod analizy ilościowej środków leczniczych. Prowadzę zajęcia dla studentów kierunku farmacja w ramach ćwiczeń z Chemii Leków oraz zajęcia fakultatywne o różnorodnej tematyce dla studentów II-V roku kierunku farmacja. Biorę udział w prowadzeniu kursów szkoleniowych w ramach kształcenia ustawicznego dla farmaceutów, a także w prowadzeniu zajęć

wchodzących w zakres studiów podyplomowych. Jako wykładowca uczestniczyłam w Szkole Letniej zorganizowanej dla studentów kierunku Chemia i Ochrona Środowiska Uniwersytetu Gdańskiego. Byłam opiekunem 16 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej w Gdańsku). Pełnię także funkcję opiekuna Apteki Szkoleniowej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej GUMed.

Za prowadzone badania naukowe i osiągnięcia dydaktyczno-organizacyjne otrzymałam osiem Nagród Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Byłam także recenzentem 12 publikacji naukowych w czasopismach: *Chromatography Research International*, *Biomedical Chromatography*, *Drug Delivery Letters*, *Springer Special Issue – Papers on environmental changes*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, *Analytical Letters*, *Journal of AOAC International* (2 publikacje), *Luminescence: The Journal of Biological and Chemical Luminescence*, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly (CI&CEQ)*, *Acta Chromatographica*.

## 6. Podsumowanie dorobku naukowego

Charakter pracy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora
Łączna liczba wszystkich prac oryginalnych i przeglądowych		<b>34</b>
Liczba opublikowanych prac oryginalnych	<b>1</b>	<b>30</b>
w tym publikacji z tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	<b>1</b>	<b>26</b>
w tym publikacji spoza tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	-	<b>4</b>
Liczba opublikowanych prac przeglądowych	-	<b>3</b>
w tym publikacji z tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	-	<b>3</b>
Łączna liczba doniesień naukowych, w tym:	<b>14</b>	<b>81</b>
posterów	13	75
komunikatów ustnych	1	6
Sumaryczny $IF^1$ prac; Punktacja <i>MNiSW</i>	<b>1,432; 9</b>	<b>65,374; 755</b>
Sumaryczny $IF^1$ wszystkich prac; Punktacja <i>MNiSW</i>		<b>66,806; 764</b>
Sumaryczna liczba cytowań wszystkich prac według bazy Web of Science <sup>2</sup> ; według bazy Scopus <sup>3</sup>	<b>162</b> (bez autocytowań 136) <sup>2</sup>	<b>192</b> (bez autocytowań 161) <sup>3</sup>
Indeks Hirscha <sup>4,5</sup>		<b>7<sup>4</sup>/8<sup>5</sup></b>

<sup>1</sup> Wartości  $IF$  zgodnie z rokiem opublikowania oprócz prac z roku 2013 (brak wskaźnika)

<sup>2</sup> Liczba cytowań publikacji według bazy Web of Science z dnia 16.01.2014 r.

<sup>3</sup> Liczba cytowań publikacji według bazy Scopus z dnia 16.01.2014 r.

<sup>4</sup> Indeks Hirscha według bazy Web of Science z dnia 16.01.2014 r.

<sup>5</sup> Indeks Hirscha według bazy Scopus z dnia 16.01.2014

Reasumując, mój dorobek naukowy przed doktoratem obejmował 1 publikację i 14 doniesień konferencyjnych o sumarycznym wskaźniku oddziaływania  $IF = 1,432$  i punktacji MNiSW = 9. Po doktoracie, na dzień 16 stycznia 2014 roku dorobek zwiększył się o kolejne 33 publikacje, w tym 30 prac oryginalnych (1 w druku) i 3 prace przeglądowe oraz 81 doniesień konferencyjnych o sumarycznym IF wynoszącym 65,374 oraz 755 punktach MNiSW, co daje całkowitą wartość wskaźnika  $IF = 66,806$  i 764 punktów MNiSW. Liczba cytowań moich publikacji na dzień 16 stycznia 2014 roku według bazy Web of Science wynosi 162 (wg Scopus 192), a indeks Hirscha opublikowanych prac według bazy Web of Science wynosi 7 (wg Scopus 8).

Alima Plewis