



**Ilona Olędzka**

**Omówienie cyklu publikacji pt.**

**Ocena wpływu parametrów warunkujących efektywność  
analiz farmaceutycznych i klinicznych techniką micelarno-  
elektrokinetycznej chromatografii (MEKC)**

**Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej  
Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Gdański Uniwersytet Medyczny**

**Gdańsk, 2015**

**1. Imię i nazwisko:** Ilona Olędzka

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

W latach 1990-1995 studiowałam na kierunku Biologia na Wydziale Biologii i Nauk o Ziemi na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. W roku 1995 w Zakładzie Ekologii Zwierząt pod kierunkiem dr. hab. Tadeusza Pawlikowskiego, przygotowałam pracę magisterską pt „Próba monitoringu występowania trzmieli na obszarze miasta Torunia”, którą obroniłam 23 czerwca 1995 roku uzyskując tytuł magistra biologii. W październiku 1995 roku rozpoczęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej w Gdańsku). Rozprawę doktorską pt. „Zastosowanie elektroforezy kapilarnej w analizie wybranych leków stosowanych w weterynarii” wykonałam pod kierunkiem kierownika Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej prof. dr. hab. Henryka Lamparczyka. Pracę doktorską obroniłam 11 marca 2003 roku uzyskując stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych.

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

15 października 1995 roku zostałam zatrudniona w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) na stanowisku asystenta. 1 stycznia 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.)**

Wiodącym tematem przedstawionego osiągnięcia naukowego była optymalizacja narzędzi bioanalitycznych, opartych na micelarno-elektrokinetycznej chromatografii (ang. *micellar-electrokinetic chromatography*, MEKC), które zastosowano w rzeczywistych aplikacjach farmaceutycznych i biomedycznych. Nadrzędnym celem przeprowadzonych badań było opracowanie szeregu efektywnych metodologii umożliwiających analizy próbek farmaceutycznych i biomedycznych w oparciu o technikę MEKC. Uzyskane wyniki badań zostały opisane w formie monotematycznego cyklu wymienionych poniżej

---

prac, opublikowanych w latach 2010-2015, o łącznym współczynniku oddziaływania **IF = 17,620** i wartości punktacji **MNiSW = 225**

**H1. Ilona Olędzka\***, Alina Plenis, Lucyna Konieczna, Piotr Kowalski, Tomasz Bączek.  
Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies, *Electrophoresis*, **2010**, 31 (14), 2356-2364.  
(*IF = 3,569, MNiSW = 32*)

**H2. Tomasz Bączek\***, **Ilona Olędzka**, Lucyna Konieczna, Piotr Kowalski, Alina Plenis.  
Biomedical evaluation of cortisol, cortisone and corticosterone along with testosterone and epitestosterone applying micellar electrokinetic chromatography [Dokument elektroniczny], *Sci. World J.*, **2012**, art. nr 268120, 8 s.  
(*IF = 1,730, MNiSW = 35*)

**H3. Ilona Olędzka\***, Piotr Kowalski, Szymon Dziomba, Piotr Szmudanowski, Tomasz Bączek.  
Optimization of a pre-MEKC separation SPE procedure for steroid molecules in human urine samples, *Molecules*, **2013**, 18 (11), 14013-14032.  
(*IF = 2,095, MNiSW = 30*)

**H4. Ilona Olędzka\***, Tomasz Bączek.  
Urinary steroids measured by modern separation techniques and applied as biomarkers in stress studies, *Curr. Pharm. Anal.*, **2010**, 6 (3), 151-163.  
(*IF = 1,710, MNiSW = 13*)

**H5. Ilona Olędzka\***, Piotr Kowalski, Tomasz Bączek, Beata Muszyńska-Furas, Jolanta Paradziej-Łukowicz, Marcin Taciak, Barbara Pastuszewska.  
Determination of water soluble vitamins in laboratory animal feeds by micellar electrokinetic chromatography, *Anal. Lett.* **2012**, 45 (7), 689-701.  
(*IF = 0,965, MNiSW = 20*)

**H6. Ilona Olędzka**, Piotr Kowalski, Alicja Bałuch, Tomasz Bączek\*, Jolanta Paradziej-Łukowicz, Marcin Taciak, Barbara Pastuszewska.  
Quantification of the level of fat-soluble vitamins in feed based on the novel

microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) method, *J. Sci. Food Agric.* **2014**, 94 (3), 544-551.

(*IF* = 1,714, *MNiSW* = 35)

**H7. Ilona Olędzka\***, Katarzyna Kaźmierska, Alina Plenis, Barbara Kamińska, Tomasz Bączek

Capillary electromigration techniques as a tools for assessing the status of vitamins A, C and E in patients with cystic fibrosis, *J. Pharm Biomed. Anal.* **2015**, 102, 45-53.

(*IF* = 2,979, *MNiSW* = 35)

**H8. Ilona Olędzka\***, Zofia Kulińska, Adam Prahl, Tomasz Bączek

Simultaneous separation of eight benzodiazepines in human urine using field-amplified sample stacking micellar-electrokinetic chromatography, *J. Anal. Toxic.* **2015**, 39(6), 436-443.

(*IF* = 2,858, *MNiSW* = 25)

\* Pełniłam funkcję autora korespondencyjnego

## WPROWADZENIE

### ***1. Obszary zastosowań oraz podstawy teoretyczne techniki micelarno-elektrokinetycznej chromatografii kapilarnej.***

W ostatnich latach techniki elektroforetyczne istotnie zyskały na znaczeniu jako wysoce wydajne narzędzie analityczne, gdyż posiadają niekwestionowane zalety w stosunku do popularnie stosowanych technik chromatograficznych w zakresie szybkości i efektywności separacji, wysokiej rozdzielczości, niewielkiego zużycia odczynników oraz niskich kosztów pojedynczych analiz. Ponadto, ze względu na niewielkie zużycie odczynników, zwłaszcza organicznych, oraz niską produkcję powstających podczas procesu separacyjnego ścieków, technika ta jest powszechnie uznawana za wysoce przyjazną środowisku. Fakt ten stanowi bardzo istotny argument przemawiający za zasadnością rozwijania technik elektromigracyjnych w wielu obszarach analitycznych. Z kolei wysoka wydajność separacji oraz możliwość jednoczesnego oznaczania zarówno cząsteczek obojętnych jak i zjonizowanych stanowią niewątpliwie o atrakcyjności techniki

micelarno-elektrokinetycznej chromatografii (MEKC) oraz jej konkurencyjności wobec metod chromatograficznych takich jak chromatografia cieczowa (HPLC) czy chromatografia gazowa (GC).

Technika MEKC, jako odmiana metod elektroforetycznych, w której poprzez zastosowanie w buforze separacyjnym jonowych miceli następuje połączenie chromatograficznych i elektroforetycznych zasad rozdzielania, została po raz pierwszy zastosowana w roku 1982 przez japońskiego naukowca prof. Shigeru Terabe [1]. Obojętny analit w wyniku oddziaływania z micelą zyskuje pozorną mobilność elektroforetyczną i podlega rozdzielaniu zgodnie z zasadami elektroforezy. Podczas rozdzielania, pod wpływem przyłożonego napięcia, anionowe micide migrują w kierunku elektrody dodatniej. Jednak w środowisku obojętnym lub zasadowym prędkość przepływu elektroosmotycznego (ang. *Electroosmotic flow*, EOF) jest większa niż prędkość przepływu elektroforetycznego (ang. *Electrophoretic flow*, EPF) miceli w kierunku anody, co powoduje przepływ całego roztworu elektrolitu wraz z micelami w kierunku elektrody naładowanej ujemnie. W efekcie, gdy analizie poddawana jest próbka zawierająca anality o charakterze obojętnym, są one inkorporowane do wnętrza miceli i migrują z prędkością taką samą jak micide. Następnie anality obojętne są oddzielone na podstawie różnicy współczynników podziału między fazą micelarną i otaczającą fazą wodną.

Kolejność migracji molekuł obojętnych w MEKC jest ściśle związana z ich hydrofobowością. Anality wykazujące bardziej hydrofobowe właściwości oddziałują silniej z micelami i migrują wolniej niż anality hydrofilowe. Ponadto, rozdzielanie elektrycznie obojętnych lub niejonowych analitów w MEKC może zapewnić także zwiększoną selektywność dla analitów poprzez jonowe oddziaływania pomiędzy jonowym analitem i micelami.

Według założeń Terabe [1,2] cząsteczki obojętne rozdzielane w MEKC ulegają podziałowi pomiędzy wspomniane fazy i poruszają się w kolejności zgodnej ze współczynnikiem podziału:

$$k = t_r - t_0 / t_0 (1 - t_r / t_{mc})$$

gdzie:  $t_r$  – czas migracji analitu oddziałującego z micelą,  $t_0$  – czas migracji substancji nie oddziałującej z micelą i pozostającej w fazie wodnej,  $t_{mc}$  – czas migracji analitu całkowicie inkorporowanego do miceli.

A zatem wzór pozwalający wyznaczyć czas migracji analitu w MEKC można wyznaczyć w następujący sposób:

$$t_r = (1 + k / 1 + (t_0/t_{mc}) k) t_0$$

przy czym czasy  $t_0$  i  $t_{mc}$  określa się za pomocą markerów. Najczęściej do wyznaczenia czasu  $t_0$  w MEKC stosuje się markery, które nie oddziałują z micelami takie jak metanol, acetonitryl, aceton lub formamid, podczas gdy  $t_{mc}$  można określić na podstawie markerów nierozpuszczalnych w wodzie, natomiast rozpuszczalnych w roztworze miceli (Sudan III lub IV, hydrofobowe kationy takie jak bromek timepidyny, halofantryna czy chlorowodorek chniny) [3-5].

Początkowo technika MEKC była używana do rozdzielania związków obojętnych, jednakże liczne badania dowiodły, że może być z powodzeniem stosowana również do bardziej selektywnego oznaczania związków obdarzonych ładunkiem [4-6]. Za jej szczególną zaletę należy uznać brak konieczności modyfikacji aparatury analitycznej przeznaczonej do klasycznych analiz elektroforetycznych, gdyż technika MEKC wymaga jedynie modyfikacji buforu separacyjnego, polegającej na dodaniu do podstawowego elektrolitu środka powierzchniowo czynnego, w stężeniu przekraczającym krytyczne stężenie micelizacji surfaktantu (ang. *critical micelle concentration*, CMC), co umożliwia tworzenie miceli. Należy podkreślić, że CMC oraz stopień agregacji miceli zależy w dużym stopniu od siły jonowej buforu, obecności dodatkowych rozpuszczalników w buforze oraz od temperatury [7]. Z tego względu, podczas opracowywania nowej metody analitycznej powyższe parametry powinny być dobierane ze szczególną starannością tak aby zapewniły wysoką efektywność separacji. Micele odgrywają kluczową rolę w rozdzielaniu analitów techniką MEKC. Amfifilowe cząsteczki środka powierzchniowo-czynnego tworzą w roztworach wodnych agregaty, posiadające grupy hydrofobowe (niepolarne) zwrócone do wewnątrz tak, aby uniknąć oddziaływań z hydrofilowym buforem [4,5,7]. Natomiast grupy jonowe (hydrofilowe) zorientowane są na zewnątrz miceli. Surfaktanty stosowane w MEKC stanowią rodzaj fazy pseudo-stacjonarnej (analogicznie do fazy stacjonarnej w HPLC). Niezmiernie istotnym jest, iż zarówno surfaktanty, jak i powstałe z nich micidele mogą posiadać ładunek dodatni lub ujemny a zatem migrują zgodnie z zasadami elektroforezy czyli w kierunku zgodnym lub przeciwnym do przepływu elektroosmotycznego.

## **2. Czynniki wpływające na selektywność analiz techniką MEKC**

Jak wspomniano powyżej, dla zapewnienia odpowiedniej wydajności procesu rozdzielania podczas opracowywania nowej metody analitycznej opartej na MEKC

kluczowym etapem jest zoptymalizowanie parametrów wpływających na efektywność rozdzieleń elektroforetycznych. A zatem każdorazowo należy ocenić wpływ wybranego rodzaju i stężenia surfaktanta, pH i siły jonowej buforu separacyjnego oraz dodawanych modyfikatorów organicznych, a także zoptymalizować parametry aparaturowe takie jak: długość i przekrój kapilary, wielkość przyłożonego napięcia, rodzaj i długość nastrojku próby do kapilary, temperatura analizy. Wiele uwagi należy poświęcić również optymalizacji procedury przygotowania materiału biologicznego do badań.

### **Rodzaj surfaktanta**

W przypadku realizacji rozdzielania techniką MEKC surfaktanty stanowią kluczowy składnik buforu separacyjnego. Wśród nich wyróżnia się surfaktanty: **anionowo czynne, kationowo czynne, dipolarne** zwane też jonami obojnaczymi, **niejonowe, mieszane micelle, pochodzenia naturalnego** oraz **mikroemulsje** [3,8].

W przypadku stosowania **surfaktantów anionowych** podczas analizy cząsteczek obojętnych duże znaczenie ma prędkość EOF. Separacja obojętnych i ujemnie naładowanych cząsteczek nie jest skuteczna, gdy pH buforu jest zbyt niskie, gdyż w tym wypadku prędkość EOF jest zbyt mała, aby powodować ruch ujemnie naładowanych miceli w kierunku katody. Z tego względu większość eksperymentów z zastosowaniem anionowych surfaktantów jest przeprowadzana z zastosowaniem elektrolitów o pH obojętnym lub zasadowym. Jak pokazują dane literaturowe najbardziej popularnym anionowym surfaktantem stosowanym w MEKC jest SDS (laurylosiarczan sodu), który charakteryzuje się niską wartością CMC oraz zapewnia dobrą selektywność i efektywność rozdzielania [3]. W temperaturze 25°C CMC dla SDS wynosi odpowiednio w czystej wodzie 8,1 mM; w 5 mM boraksie 5,3 mM; w mieszaninie 100 mM boraksu i 100 mM dwuwodorofosforanu sodu jedynie 2,0 mM [8]. Surfaktant ten tworzy sferyczne micelle posiadające na powierzchni ugrupowania jonowe oraz hydrofobowy rdzeń. Anionowy charakter grup sulfonowych na powierzchni miceli powoduje, że zarówno sam surfaktant jak i tworzone przez niego micelle wykazują mobilność elektroforetyczną w kierunku elektrody dodatniej – anody, czyli w kierunku przeciwnym do silnego EOF w zasadowym pH. W rezultacie, micelle SDS migrują wolno, ale ich wypadkowy ruch odbywa się w kierunku katody [1,4]. Według pioniera techniki MEKC, prof. Terabe, oddziaływanie analitu z micelą może przebiegać według różnych mechanizmów. W przypadku analitów hydrofobowych i niepolarnych dochodzi do inkorporacji analitu do hydrofobowego rdzenia miceli lub adsorpcji analitu na powierzchni miceli. Z praktycznego punktu widzenia, im mniejsza polarność badanej substancji, tym większy odsetek cząsteczek

analitu będzie migrował we wnętrzu miceli i w konsekwencji tym później dotrze do detektora. W ten sposób, możliwe jest rozdzielanie substancji pozbawionych ładunku, co może znacząco ułatwiać separację oznaczanych związków od substancji pochodzących z matrycy biologicznej. Ważnym anionowym surfaktantem o potwierdzonej przydatności w analizach cząsteczek zjonizowanych jest także LMT (sodium N-lauroyl-N-methyltaurate), którego CMC wynosi 8,7 mM. Inną grupą surfaktantów anionowych są syntetyzowane w wątrobie **surfaktanty pochodzenia naturalnego**, które stanowią sole kwasów żółciowych o strukturze steroidowej. Są one szeroko stosowane w MEKC podczas separacji zarówno obojętnych jak i jonowych analitów. Najbardziej popularne to cholan sodu (SC) oraz taurocholan sodu (STC). W solach kwasów żółciowych słabiej rozpuszczają się hydrofobowe cząsteczki obojętne w porównaniu do SDS, jednakże stanowią dobrą alternatywę dla analizy silnie lipofilowych związków obojętnych, które nie mogą być oznaczane przy użyciu SDS.

Zastosowanie **surfaktantów kationowych** w MEKC powoduje odwrócenie przepływu EOF z powodu elektrostatycznych interakcji pomiędzy ujemnie naładowaną ścianą kapilary a dodatnio naładowanymi cząsteczkami miceli. Odwrócenie przepływu ma miejsce nawet przy użyciu tych surfaktantów w stężeniu poniżej CMC. Dla najbardziej popularnego surfaktanta kationowego jakim jest bromek cetyltrimetyloamoniowy (CTAB) efekt ten jest obserwowany w zakresie 0,032 do 0,1 mM. Surfaktanty te poprawiają efektywność separacji aminokwasów oraz dodatnio naładowanych peptydów [8].

Udowodniono także, że praktycznie zerowa mobilność elektroforetyczna **neutralnych surfaktantów** nie może być wykorzystywana do rozdzielania cząsteczek obojętnych, ale potwierdzono ich skuteczność w analizie cząsteczek zjonizowanych [9]. W przypadku stosowania niejonowych środków powierzchniowo czynnych unika się problemów, powszechnie występujących przy jonowych surfaktantach, związanych z nadmiernym wydzielaniem ciepła Joula, co oznacza, że środki niejonowe mogą być dodawane do buforu w wysokim stężeniu, a w trakcie rozdzielania elektroforetycznego mogą być używane wysokie napięcia. Neutralne surfaktanty takie jak Tween 20 (polioksyetyleno-sorbitan monolaurylowy) czy Brij 35 (eter polioksyetyleno-23-laurylowy) mogą być stosowane w kwaśnym środowisku w analizie peptydów, gdzie w sposób znaczący poprawiają wydajność separacji [9]. Z kolei **surfaktanty dipolarne** w MEKC są stosowane zarówno w celu tworzenia micelarnej fazy pseudostacjonarnej, jak i w celu dynamicznego powlekania wewnętrznej ściany kapilary podczas analizy. Popularny surfaktant dipolarny PAPS (3-(N,N-



dimetyloheksadecyloamoniowy)propanosulfonian), w buforach o niskim pH jest używany w analizie polipeptydów [8].

W micelarnej elektrokinetycznej chromatografii w celu poprawy selektywności stosowane mogą być także **micelle mieszane** czyli układy składające się z surfaktantów anionowych i niejonowych, dwóch surfaktantów anionowych, czy surfaktantów anionowych i kationowych [8,10,11]. Najważniejszą zaletą systemów mieszanych surfaktantów jest wspomniany już brak lub mały wzrost natężenia prądu podczas separacji wynikający najczęściej z obecności surfaktantów neutralnych czy obojnaczych.

**Mikroemulsje** stanowią szczególny rodzaj fazy pseudostacjonarnej, a aplikacje związane z ich stosowaniem są wręcz traktowane jako odrębna odmiana techniki MEKC, nazywana mikroemulsyjną elektrokinetyczną chromatografią (MEEKC) [12-14]. W tej odmianie kluczowym elementem jest bufor separacyjny, który ze względu na skład nazywany jest mikroemulsją. Mikroemulsja to homogenna i transparentna mieszanina zawierająca zmieszane w odpowiednim stosunku lipofilowe rozpuszczalniki organiczne, surfaktanty, kosurfaktanty oraz fazę wodną. W technice MEEKC fazę pseudostacjonarną stanowią nanometrowej wielkości kropelki oleju otoczone cząsteczkami surfaktanta, który zmniejsza napięcie powierzchniowe na granicy obu faz. Jednakże, podobnie jak w technice MEKC, zastosowany surfaktant pełni swą rolę jedynie w stężeniu przekraczającym CMC. Dodatkowo zastosowany kosurfaktant pozwala na zahamowanie elektrostatycznego odpychania się pomiędzy cząsteczkami surfaktanta oraz efektywnie zmniejsza napięcie powierzchniowe na granicy fazy olejowej i wodnej podczas formowania mikroemulsji. Te unikalne właściwości mikroemulsji sprawiają, iż technika MEEKC może być stosowana do analizowania substancji zarówno obojętnych, jak i obdarzonych ładunkiem, jak również do jednoczesnego oznaczania substancji hydrofobowych i hydrofilowych. Analizowane związki ulegają podziałowi pomiędzy obie fazy w zależności od swoich właściwości i wchodzą w interakcje z naładowanymi kropelkami mikroemulsji.

#### ***pH buforu, temperatura oraz modyfikatory organiczne***

Wybór pH buforu separacyjnego jest jednym z ważniejszych parametrów w technikach elektromigracyjnych, ponieważ bezpośrednio wpływa na wielkość przepływu elektroosmotycznego. Jeśli anality są obdarzone ładunkiem to zmiany pH buforu separacyjnego prowadzą do zmian w stopniu dysocjacji, wpływają na ich ładunek oraz mobilność elektroforetyczną. W pH kwaśnym, przy stosunkowo niskiej wartości

prędkości EOF, zastosowanie anionowych surfaktantów może być utrudnione lub niezasadne, gdyż anionowe micelle o dużej mobilności elektroforetycznej będą poruszały się do elektrody dodatniej zamiast do katody. W przypadku zastosowania najbardziej popularnego surfaktanta anionowego - SDS, taka sytuacja ma miejsce w przypadku elektrolitów o pH poniżej 5. Warto zwrócić uwagę, że w przypadku analitów zjonizowanych ich wartości pKa w zależności od pH roztworów micelarnych mogą ulegać zmianie i mieć wpływ na selektywność metody. Związki o podobnych wartościach pKa w roztworach wodnych mogą wykazywać różne wartości pKa w roztworach micelarnych. Większe trudności analityczne sprawia sytuacja odwrotna, gdy związki o różnych wartościach pKa w roztworze wodnym mają zbliżone wartości w roztworach micelarnych. Konsekwencją tego zjawiska jest bowiem większa zmiana selektywności niż w przypadku podstawowej kapilarnej elektroforezy strefowej (CZE) [3,8,15]. A zatem wpływ pH na ładunek analitu i selektywność metody jest bardzo ważny i należy go uwzględniać podczas projektowania metody MEKC.

Kolejnym istotnym czynnikiem jest temperatura, której zmiany szczególnie wpływają na rozdzielczość metody i powtarzalność czasów migracji analitów. W nowoczesnych aparatach do elektroforezy kapilarnej utrzymanie stałej temperatury podczas analizy jest najczęściej realizowane poprzez zastosowanie płynu chłodzącego tzw. coolanta lub stałą cyrkulację powietrza wokół kapilary. Niestety, nawet nieznaczne obniżenie sprawności systemu chłodzenia kapilary może generować zmianę temperatury, która z kolei wpływa na lepkość buforu, stałą dielektryczną a w skrajnych przypadkach na skład powierzchni krzemionkowej ściany kapilary [3]. Wzrost temperatury powoduje obniżenie lepkości buforu micelnego, wzrost prędkości EOF oraz wzrost prędkości elektroforetycznej miceli, a to w konsekwencji prowadzi do zmian czasów migracji analitów.

Parametrem krytycznym jest także rodzaj zastosowanego modyfikatora organicznego, który może zmieniać wartość współczynnika podziału analitu pomiędzy fazy micelną i wodną. W przypadku analitów hydrofobowych, modyfikator poprawia ich rozpuszczalność w wodnym buforze oraz obniża prędkość EOF, co często prowadzi do poprawy wydajności separacji [4,5,9]. W technice MEKC, jako dodatki organiczne do buforów separacyjnych najczęściej stosowane są metanol, acetonitryl, etanol, 2-propanol oraz ich mieszaniny [16,17]. Rzadziej stosowane są tetrahydrofuran czy dimetyloformamid [3,5,16]. Z praktycznego punktu widzenia, poza rodzajem zastosowanego modyfikatora, ważne jest także jego stężenie w buforze separacyjnym.

Jego optymalna wartość dla metanolu i acetonitrylu mieści się w zakresie od 5 do 25%. Należy jednak każdorazowo podczas projektowania metody MEKC zwrócić uwagę na wpływ modyfikatora na agregację lub dysocjację miceli, co także decyduje o jakości rozdzieleń elektroforetycznych.

### ***Przygotowanie materiału biologicznego***

Skuteczne zastosowanie technik elektroforetycznych w analizach jakościowo-ilościowych wymaga opracowania i optymalizacji metody w taki sposób, aby nie tylko spełniała kryteria walidacyjne stawiane metodom analitycznym, ale także umożliwia oznaczenie analitów na poziomie wymaganym dla danej aplikacji farmaceutycznej bądź klinicznej. Aby zrealizować to zadanie konieczne jest właściwe przygotowanie próbki do analizy wybraną techniką separacyjną, a to wymaga doboru optymalnych warunków ekstrakcji oznaczanych analitów z materiału badawczego. Powyższy etap obejmuje zatem selektywą izolację analitów, wzbogacenie, upochodnienie (jeśli wymaga tego sposób detekcji), oraz oczyszczenie ekstraktu z substancji balastowych. Trzeba jednak zauważyć, że procedura przygotowania prób jest silnie uwarunkowana zarówno rodzajem matrycy, jak i wyborem metody analitycznej oraz sposobem detekcji analitów. W przypadku technik elektromigracyjnych, w tym także MEKC, dla zapewnienia optymalnej rozdzielczości, matryca próbki (bufor do próbek) z reguły nie powinna zawierać rozpuszczalników organicznych. Z tego względu do finalnego rozpuszczenia ekstraktu próbki najczęściej stosuje się dejonizowaną wodę lub odpowiednio rozcieńczony bufor separacyjny.

## CEL BADAŃ

Możliwości, jakie dostarcza technika MEKC stały się inspiracją do prowadzonych przeze mnie badań, których wyniki zostały zawarte w ośmiu publikacjach [H1-H8] stanowiących spójny cykl przedstawionego osiągnięcia naukowego. Głównym celem tych badań było wyjaśnienie mechanizmów rozdzieleń elektroforetycznych techniką micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC), co znacząco usprawnia opracowanie i optymalizację nowatorskich metod oznaczania substancji biologicznie czynnych w próbkach, zwiększając aplikacyjność i efektywność technik elektroforetycznych w analizach farmaceutycznych i biomedycznych. Osiągnięcie zamierzonego celu głównego wymagało zaplanowania i realizacji celów szczegółowych, które dotyczyły:

- I. Opracowania metody oznaczania hormonów steroidowych w moczu ludzkim metodą MEKC poprzez optymalizację parametrów wpływających na separację hormonów sterydowych oraz optymalizację procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej [H1-H4]
  
- II. Opracowania metody oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w tłuszczach w różnorodnych matrycach biologicznych z zastosowaniem technik MEKC oraz MEEKC [H5-H7]. Wymagało to przeprowadzenia badań dotyczących:
  - a. optymalizacji parametrów wpływających na separację witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz rozpuszczalnych w tłuszczach metodą MEKC lub MEEKC
  - b. optymalizacji procedury ekstrakcji witamin rozpuszczalnych w wodzie w zależności od rodzaju matrycy biologicznej (mocz, pasza dla zwierząt laboratoryjnych)
  - c. optymalizacji procedury ekstrakcji witamin rozpuszczalnych w tłuszczach w zależności od rodzaju matrycy biologicznej (surowica krwi, pasza dla zwierząt laboratoryjnych)
  
- III. Opracowania metody oznaczania pochodnych benzodiazepiny w moczu ludzkim metodą MEKC w połączeniu z techniką wzmacniania sygnału on-line w kapilarze poprzez optymalizację parametrów wpływających na separację oraz optymalizację procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej [H8]

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

### ***I. Opracowanie metody oznaczania hormonów steroidowych w moczu ludzkim metodą MEKC poprzez optymalizację parametrów wpływających na separację hormonów sterydowych oraz optymalizację procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej***

[H1] Ilona Olędzka\*, Alina Plenis, Lucyna Konieczna, Piotr Kowalski, Tomasz Bączek. Micellar electrokinetic chromatography for the determination of cortisol in urine samples in view of biomedical studies, *Electrophoresis*, 2010, 31 (14), 2356-2364.

[H2] Tomasz Bączek\*, Ilona Olędzka, Lucyna Konieczna, Piotr Kowalski, Alina Plenis. Biomedical evaluation of cortisol, cortisone and corticosterone along with testosterone and epitestosterone applying micellar electrokinetic chromatography [Dokument elektroniczny], *Sci. World J.*, 2012, art. nr 268120, 8 s., bibliogr. 28 poz.

[H3] Ilona Olędzka\*, Piotr Kowalski, Szymon Dziomba, Piotr Szmudanowski, Tomasz Bączek. Optimization of a pre-MEKC separation SPE procedure for steroid molecules in human urine samples, *Molecules*, 2013, 18 (11), 14013-14032.

[H4] Ilona Olędzka\*, Tomasz Bączek. Urinary steroids measured by modern separation techniques and applied as biomarkers in stress studies, *Curr. Pharm. Anal.*, 2010, 6 (3), 151-163.

W literaturze naukowej opublikowano szereg prac dotyczących oznaczania hormonów steroidowych metodami chromatograficznymi czy enzymatycznymi, a mimo to problem ich wiarygodnego oznaczania na poziomie stężeń występujących w warunkach fizjologicznych jest nadal aktualny. Szczególnie w ostatnim okresie duży nacisk kładzie się na rozwój technologii przyjaznych środowisku, podczas gdy wspomniane powyżej metody zużywają znaczne ilości toksycznych rozpuszczalników. W świetle tych danych oraz ze względu na ograniczoną liczbę opracowań dotyczących zastosowania techniki MEKC w analizie hormonów sterydowych w moczu ludzkim, wydało się zasadne podjęcie tematu oceny możliwości aplikacyjnych tej techniki elektroforetycznej w praktyce klinicznej. Było to tym bardziej uzasadnione, że MEKC jest uznawana za narzędzie wysoce ekologiczne, a tym samym jest interesującą alternatywą dla powszechnie stosowanych metod LC, GC czy technik enzymatycznych. Powyższe

zagadnienie stało się tematem przewodnim czterech prezentowanych prac [H1-H4]. Wśród nich, trzy dotyczą bezpośrednio opracowania metod oznaczania hormonów stroidowych w oparciu o technikę MEKC oraz ich zastosowań w analizach realnych próbek moczu [H1-H3]. Publikacja [H4] stanowi przegląd metodologii oznaczania hormonów steroidowych w moczu w oparciu o różne techniki separacyjne.

W początkowym etapie moich badań opracowałam metodę oznaczania kortyzolu (hydrokortyzonu) w moczu ludzkim [H1], jako przydatnego wskaźnika mającego szerokie zastosowanie w badaniach klinicznych. Jego poziom we krwi lub moczu jest pomocny w ocenie zaburzeń funkcjonowania osi podwzgórze-przysadka-nadnercze takich jak: choroba Addisona czy zespół Cushinga [18]. Co więcej, jest on uznanym biomarkerem narażenia na stres, a stosunek kortyzolu do jego metabolitu (kortyzonu) może być także użytecznym wskaźnikiem zaburzeń depresyjnych [19]. Nieprawidłowy poziom obu hormonów obserwuje się w insulinooporności, otyłości, nadciśnieniu czy cukrzycy typu 2 [20-23]. Ponadto poziom kortyzolu, wraz z innymi hormonami steroidowymi, bywa pomocny w diagnostyce bezpłodności, hipoaldosteronizmu, hirsutyzmu a także w ocenie aktywności enzymów (np. dehydrogenazy  $11\beta$ -hydroksysteroidowej typu 2 czyli  $11\beta$ -HSD typu 2) [24]. W badaniach próbek moczu sportowców poziom tego hormonu pozwala potwierdzić syndrom przetrenowania (jako współczynnik wolnego testosteronu do kortyzolu) czy stosowanie dopingu [25,26]. Zatem, z uwagi na fakt, iż szereg innych hormonów steroidowych także pełni funkcję istotnych czynników diagnostycznych, w kolejnych pracach rozszerzyłam zakres analizowanych substancji, włączając do analiz: testosteron, epitestosteron,  $17\alpha$ -metylotestosteron oraz progesteron [H2, H3]. Badania takie są istotne gdyż poziom testosteronu u mężczyzn może być wskaźnikiem hypogonadyzmu, obniżonego libido, zaburzeń erekcji i płodności [18,20]. U kobiet podwyższony poziom tego hormonu jest powodem zaburzeń w cyklu menstruacyjnym oraz trudności w zajściu w ciążę. W niektórych przypadkach jest objawem rozwoju nowotworu wydzielającego androgeny, wrodzonego przerostu nadnerczy czy policystycznych jajników [24]. Należy podkreślić, iż stosunek testosteronu do epitestosteronu jest często stosowanym wskaźnikiem w badaniach antydopingowych sportowców [25,26].

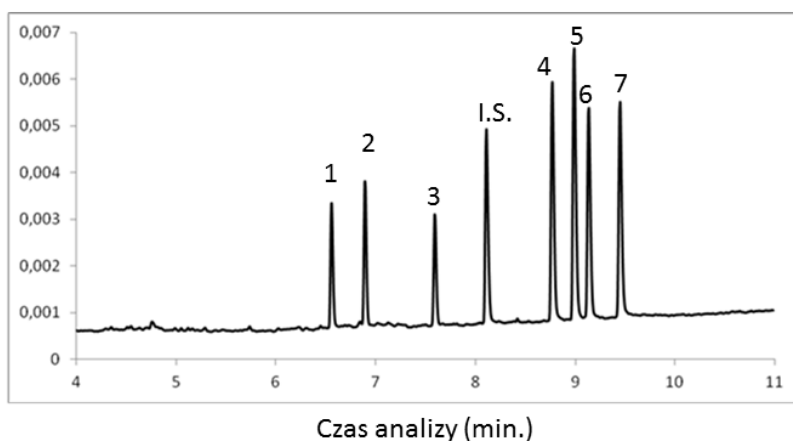
W każdym przypadku, prace analityczne rozpoczynałam od dobrania optymalnych parametrów elektroforetycznych wpływających na jakość rozdzielania. W pierwszej kolejności ustaliłam skład buforu separacyjnego starannie dobierając charakter chemiczny i stężenie poszczególnych jego składników oraz wartości pH. Jak wspomniałam w części

wstępnej, w technice MEKC, do buforu separacyjnego dodawany jest surfaktant w odpowiednim stężeniu, zapewniającym utworzenie miceli, które są czynnikiem poprawiającym selektywność analitów obojętnych [3,4,8]. W tym celu zastosowałam jeden z najpopularniejszych surfaktantów anionowych - SDS, a optymalne jego stężenie określiłam dodając do buforu boranowego SDS w zakresie od 10 do 50 mM. Zaobserwowałam, że wzrost stężenia SDS w buforze powodował nieznaczne wydłużanie czasów migracji analitów prowadząc do poprawy rozdzielczości oznaczanych hormonów w tym także deksametazonu zastosowanego jako standard wewnętrzny [H1]. Stężenie SDS w zakresie od 25 do 50 mM zapewniało dobrą rozdzielczość analitów wynikającą z różnego współczynnika podziału każdego z nich pomiędzy fazy micelną i wodną, podczas gdy dalszy wzrost stężenia SDS w buforze (powyżej 50 mM) skutkowałam jedynie wzrostem siły jonowej buforu a w konsekwencji wzrostem natężenia generowanego prądu oraz wzrostem wydzielanego ciepła Joula. Było to zjawisko niekorzystne, i prowadziło do znaczącego pogorszenia powtarzalności czasów migracji analitów. Wyniki badań dowiodły, że zwiększenie stężenia boraksu w buforze separacyjnym z 10 mM w pracy [H1] do 20 mM w pracy [H2] pozwoliło na jednoczesne obniżenie stężenia SDS z 50 do 25 mM bez pogorszenia rozdzielczości opracowanej metody. Wynika to z faktu, iż CMC dla SDS obniża się wraz ze wzrostem siły jonowej elektrolitu. Odmienny efekt zaobserwowałam po dodaniu do buforu separacyjnego amfiprotycznych modyfikatorów takich jak metanol czy etanol, które powodowały wzrost wartości CMC dla SDS, a to z kolei wymagało zwiększenia stężenia SDS w buforze separacyjnym. W rezultacie, znaczącą poprawę rozdzielczości metody oznaczania szerszego spektrum analitów uzyskałam poprzez dodanie 10% metanolu do elektrolitu przy jednoczesnym zwiększeniu stężenia SDS do 50 mM. Powyższe wyniki badań przedstawiłam w pracy [H3].

W trakcie optymalizacji metod oznaczania hormonów steroidowych techniką MEKC brałam pod uwagę także wartość pH elektrolitu, gdyż jakość rozdzielania obojętnych cząsteczek, a takimi są wspomniane anality, w dużym stopniu zależy od pH elektrolitu [27]. Wraz ze wzrostem pH obserwuje się bowiem wzrost prędkości EOF co z kolei powoduje skrócenie czasów migracji analitów oraz poprawia rozdzielczość. W przypadku oznaczania hormonów steroidowych w moczu zaobserwowałam, iż bufor o pH powyżej 8, zawierające tetraboran sodu oraz SDS [H1, H2], a także dodatek 10% metanolu [H3] w porównaniu do buforów o pH poniżej 7, zapewniły najbardziej optymalne warunki rozdzielania, podczas których anality migrowały w kolejności zgodnej ze zwiększającymi się właściwościami hydrofobowymi. W środowisku kwaśnego buforu

(10 lub 20 mM dwuwodorofosforan sodu i 25 mM SDS), obserwowałam efekt przeciwny, czyli bardziej hydrofobowe anality wędrowały wcześniej, a zredukowana prędkość EOF w środowisku kwaśnym dodatkowo wydłużyła czas migracji analitów gdyż w pH poniżej 5 kierunek migracji miceli ulega zmianie na skutek zredukowania prędkości EOF [9,17,28].

Kolejnym etapem optymalizacji składu buforu separacyjnego w MEKC jest możliwość zastosowania mieszającego się z wodą modyfikatora organicznego, który wpływa na zmianę współczynnika podziału analitu pomiędzy fazy micelarną i wodną. Z danych literaturowych wynika, że w przypadku analitów hydrofobowych modyfikator poprawia ich rozpuszczalność w buforze separacyjnym [4,5,9,16,17]. Nie bez znaczenia jest także wpływ modyfikatora na prędkość EOF, która najczęściej ulega obniżeniu. W związku z powyższym, oceniłam dodatek modyfikatora organicznego (metanolu) do buforu separacyjnego na efektywność separacji analitów w zakresie od 10 do 20%. Jak wskazują wyniki zamieszczone w pracach [H1] i [H2], nie zaobserwowałam poprawy efektywności separacji analitów w obecności metanolu w elektrolicie. Ponadto zauważyłam, że zawartość 20% metanolu w buforze separacyjnym powodowała wręcz obniżenie rozdzielczości spowodowane tzw. “ogonowaniem” pików. Odwrotne rezultaty uzyskałam w badaniach opisanych w pracy [H3], gdzie wraz ze wzrostem liczby analitów o bardzo podobnych właściwościach (testosteron, 17 $\alpha$ -metylotestosteron, epitestosteron i progesteron) dodanie 10% metanolu do buforu separacyjnego poprawiło efektywność separacji (Rys. 1).



**Rysunek 1.** Elektroferogram otrzymany podczas separacji próbki moczu zawierającej hormony sterydowe; każdy w stężeniu 100 ng/ml (na podstawie Rys. 2 z pracy [H3]).

Anality: 1 - kortyzon, 2 - kortyzol, 3 - kortykosteron, IS - deksametazon, 4 - testosteron, 5 - 17 $\alpha$  – metylotestosteron, 6 - epitestosteron, 7 - progesteron.

Warunki: detekcja UV 254 nm, kapilara krzemionkowa (57cm  $\times$  50  $\mu$ m I.D.), temp. 22°C, bufor separacyjny złożony z 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>, 50 mM SDS i (10:90, v/v) metanol.



Należy jednak zaznaczyć, że jednocześnie wymagało to zwiększenia stężenia SDS w elektrolicie. Poprawa efektywności separacji w przypadku obecności niewielkiej ilości metanolu jest w tym wypadku wynikiem korzystnej zmiany współczynnika podziału analitów pomiędzy micelle oraz część wodną buforu. Zaobserwowałam, podobnie jak we wcześniejszych eksperymentach, iż dalszy wzrost stężenia metanolu w elektrolicie (>15%) powodował wydłużanie czasów migracji analitów, a tym samym całej analizy, aż do znaczącego pogorszenia efektywności separacji związanej z „ogonowaniem” pików (przy 20% metanolu w elektrolicie). Ponadto stwierdziłam zanik efektu agregacji miceli przy stężeniu metanolu powyżej 30% objawiający się znaczącym pogorszeniem selektywności metody dla oznaczanych analitów. Podobne obserwacje potwierdzają także inni naukowcy [8].

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów zoptymalizowałam także pozostałe parametry aparaturowe wpływające na efektywność rozdzielania. Zastosowałam krzemionkowe niemodyfikowane kapilary o długości 57 cm i przekroju wewnętrznym 50  $\mu\text{m}$  [**H1**, **H2**] lub 75  $\mu\text{m}$  [**H3**]. Kapilary o większym przekroju pozwoliły wydłużyć drogę optyczną wiązki światła z detektora UV, przez co nieznacznie zwiększyła się czułość metody. Wielkość przykładanego napięcia w każdym przypadku była kompromisem pomiędzy dobrą rozdzielczością a czasem analizy. W przeprowadzonych badaniach, dobre rezultaty osiągałam stosując napięcie rzędu 17 kV [**H2**], 20 kV [**H1**] oraz 24 kV [**H3**].

Jak wspomniałam we wstępie, istotnym etapem oznaczeń analitów, niezależnie od rodzaju zastosowanej techniki separacyjnej, jest właściwe przygotowanie próbek do analizy. W przypadku analizy hormonów steroidowych zbadalam wydajność ekstrakcji analitu oraz stopień oczyszczenia próby z substancji balastowych stosując techniki ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE) lub ciecz-ciało stałe (SPE). W pracy [**H1**] anality o charakterze hydrofobowym, takie jak kortyzol czy deksametazon, początkowo ekstrahowałam z próbek moczu techniką LLE stosując do ekstrakcji octan etylu lub dichlorometan. Pozwoliło to na osiągnięcie zadowalających wydajności procesu ekstrakcji na poziomie 82,5-93,8% w przypadku octanu etylu oraz 90,5-99,0% przy zastosowaniu dichlorometanu. Jednakże opracowana metoda wymagała użycia stosunkowo dużej ilości toksycznych odczynników organicznych (negatywny wpływ na środowisko), co skłoniło mnie do przeprowadzenia kolejnych eksperymentów bazujących na ekstrakcji SPE. Zastosowałam kolumnienki ekstrakcyjne wypełnione żelem krzemionkowym z chemicznie związanymi grupami oktadecylowymi (C18). Ten niepolarny sorbent o charakterze

hydrofobowym stosowany jest do izolacji związków niepolarnych i średnio polarnych z polarnych matryc, a więc gwarantował odpowiednią wydajność procesu ekstrakcji sterydów z próbek moczu. Najwyższą wydajność procesu ekstrakcji (od 97,5 do 104,9 %) zapewniło zastosowanie metanolu jako eluentu do wymywania zaadsorbowanych na kolumnkach C18 analitów. Ponadto, ekstrakcja SPE w porównaniu z LLE zapewniła skuteczniejsze oczyszczenie matrycy biologicznej z substancji balastowych, a także pozwoliła na zatężenie analitu oraz znaczną redukcję ilości odczynników organicznych. W pracy [H2] przed ekstrakcją SPE wprowadziłam dodatkowy etap kwaśnej hydrolizy, który umożliwił oznaczenie całkowitej ilości hormonów sterydowych w matrycy biologicznej (moczu). Hydroliza kwaśna została prowadzona z użyciem 0,5 ml 36% kwasu solnego przez 1 godz w temperaturze 95°C. Jest to jedna z opisywanych w literaturze strategii wyznaczania profili hormonów sterydowych, które mogą być oznaczane jako formy wolne analitu (procedury nie wymagające etapu hydrolizy) [29,30] jak i oparte na oznaczaniu całkowitej ilości hormonów w matrycy biologicznej (procedury uwzględniające etap hydrolizy kwaśnej lub enzymatycznej) [31]. Następnie przeprowadziłam ekstrakcję analitów z moczu techniką SPE. Spośród testowanych kolumniek ekstrakcyjnych (C8, C18, CN, HLB), ze względu na większy panel analitów, wybrałam kolumniki o właściwościach hydrofilowo-lipofilowych (HLB). Jak potwierdzają dane literaturowe, tego typu kolumniki mogą być z powodzeniem stosowane do ekstrakcji szerokiego spektrum analitów różniących się właściwościami hydrofobowymi z próbek o charakterze polarnym [25,32,33]. Najwyższą wydajność ekstrakcji otrzymałam po zastosowaniu kolumniek HLB oraz z metanolem jako eluentem (od 92,1 do 95,8%). Ponadto skutecznym sposobem oczyszczenia matrycy oraz usunięcia ciemnego pigmentu z próbki powstałego po hydrolizie kwaśnej, było wprowadzenie dodatkowego etapu wymywania zanieczyszczeń z kolumniek za pomocą mieszaniny aceton-woda (25:75, v/v) oraz 2% wodorotlenku amonu w 50% metanolu. Etap ten wprawdzie nie wpłynął na wydajność ekstrakcji analitów, ale znacząco poprawił jakość “tła” analizowanej próbki w obrazie elektroforetycznym. Powyższą procedurę zastosowałam także podczas realizacji pracy [H3], w której oprócz wyżej wymienionych hormonów analizowałam także 17 $\alpha$ -metylotestosteron oraz progesteron. Jedyną modyfikacją procedury polegała na zastąpieniu hydrolizy kwaśnej, hydrolizą enzymatyczną z  $\beta$ -glukuronidazą. Przewaga hydrolizy enzymatycznej polega na bardziej specyficznej reakcji hydrolizy substancji wydalanych z moczem w postaci glukuronianów,

gdyż przebiega w łagodniejszych warunkach temperaturowych, jednakże jest bardziej czasochłonna.

Podsumowując ten nurt moich badań poświęconych oznaczaniu hormonów steroidowych stwierdziłam, iż efektem przeprowadzonych eksperymentów było pełniejsze zrozumienie zjawisk zachodzących podczas rozdzieleń elektroforetycznych tej grupy analitów, co dało podstawę do opracowania optymalnych warunków ich separacji oraz dobrania warunków procedury przygotowania badanych próbek do analizy. Opracowałam nowatorskie podejście do analizy kortyzolu w próbkach moczu techniką MEKC [H1], a jej możliwości aplikacyjne potwierdziłam analizując próby moczu porannego pobranego od 29 zdrowych ochotników. Stwierdziłam, że ze względu na niskie stężenie tego hormonu w moczu oraz ograniczoną czułość detektora UV, konieczna była prekoncentracja analitu ze stosunkowo dużej objętości moczu (15 ml) co umożliwiło oznaczenie kortyzolu na poziomie fizjologicznym. Wprawdzie tak duża objętość próby stanowiła pewną niedogodność analityczną, jednakże należy zauważyć, że mocz jest materiałem biologicznym stosunkowo łatwo i bezinwazyjnie pobieranym od pacjenta. Dowiedziono bowiem, że sama procedura pobierania krwi od pacjenta indukuje reakcję stresową, co może obniżać wiarygodność diagnostyczną uzyskanych wyników badań kortyzolu w tym materiale biologicznym [34,35]. W wyniku przeprowadzonych analiz określiłam średnie stężenie kortyzolu na poziomie  $160,8 \pm 76,7$  ng/ml, podczas gdy u 11 osób poziom tego hormonu dla porannej zbiórki moczu przekraczał wartości fizjologiczne (50-200 ng/ml) i mieścił się w zakresie od 202,5 do 339,3 ng/ml. Otrzymane wyniki mogą sugerować zwiększoną wrażliwość na stres lub wskazywać na inne zaburzenia związane z wydzielaniem tego markera u tych osób, co wymaga dalszej pogłębionej diagnostyki. Niewątpliwą zaletą opracowanej techniki MEKC okazały się w tym przypadku krótszy czas analizy oraz niewielkie zużycie odczynników organicznych w porównaniu do HPLC. Elementem nowości w pracy [H2] było zastosowanie MEKC do jednoczesnej analizy pięciu hormonów w czasie 8 minut. Tym samym mogłam określić nie tylko poziom hormonów związanych z odpowiedzią organizmu na stres (kortyzol, kortyzon, kortykosteron), ale także ocenić poziom endogennych androgenów u mężczyzn i kobiet oraz stosunek testosteronu do epitestosteronu jako wskaźnik stosowania dopingu. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów oceniłam, że poziom kortyzolu u większości badanych osób mieścił się w wartościach fizjologicznych, zaś stosunek kortyzolu do kortyzonu był w przedziale od 0,11 do 1,54 i nie wskazywał na poważne zaburzenia metaboliczne ani na nadciśnienie tętnicze. Dane literaturowe dowodzą bowiem, że

stosunek obu tych hormonów umożliwi ocenę aktywności enzymu dehydrogenazy  $11\beta$ -hydroksy-sterydowej typu 2, która metabolizuje aktywny kortyzol do nieaktywnego kortyzonu. Obniżenie aktywności enzymu prowadzi do podwyższenia poziomu kortyzolu, zatrzymania wody w organizmie i w konsekwencji może być przyczyną nadciśnienia tętniczego lub innych zaburzeń sercowo-naczyniowych. Otrzymane wyniki poziomu testosteronu i epitestosteronu u mężczyzn nie ujawniły zaburzeń w wydzielaniu androgenów w badanej grupie, a stosunek testosteronu do epitestosteronu wynosił od 1,1 do 3,6 a więc nie przekraczał 4. To dowodzi, że osoby badane nie stosowały dopingu anabolicznego.

Głównym celem badań opisanych w pracy [H3] było opracowanie nowej strategii pozwalającej na jednoczesną analizę zarówno endo jak i egzogennych hormonów steroidowych, opartej o technikę MEKC i jej zastosowanie do badań biomedycznych amatorów sportów siłowych w aspekcie stosowania dopingu hormonalnego oraz oceny odporności na stres. Badania prowadziłam w grupie złożonej z amatorów sportów siłowych stosujących doping hormonalny, amatorów sportów siłowych nie stosujących dopingu oraz zdrowych ochotników. Wyniki uzyskane w grupie osób deklarujących stosowanie dopingu hormonalnego potwierdziły znaczne przekroczenie wartości fizjologicznych testosteronu (średnio  $2300 \pm 1,14$  mg/ml) i epitestosteronu (średnio  $225,1 \pm 61,1$  ng/ml), a także podwyższony stosunek testosteronu do epitestosteronu (E/ET), który wynosił od 5,05 do 14,23. W grupie sportowców nie stosujących dopingu oraz w grupie kontrolnej wartości te mieściły się w zakresie fizjologicznym i wyniosły średnio  $81,7 \pm 5,3$  mg/ml dla testosteronu i  $41,3 \pm 8,7$  ng/ml dla epitestosteronu, przy czym średnia wartość stosunku T/ET wynosiła 2,05 dla sportowców nie stosujących dopingu i 0,4 w grupie kontrolnej. Zasadność tych badań potwierdza fakt, iż testosteron oraz jego pochodne, są bardzo często nadużywane ze względu na wywoływany efekt anaboliczny. W badanej grupie osób oceniłam także poziom hormonów związanych z reakcją na stres. U wszystkich badanych osób stwierdziłam podwyższony poziom kortyzolu, który mieścił się w zakresie od 279,5 do 349,6 ng/ml w grupie kontrolnej, od 167,6 do 185,1 ng/ml w grupie sportowców nie stosujących dopingu oraz od 170,7 do 553,1 ng/ml w grupie sportowców deklarujących stosowanie dopingu.

Ostatnią publikacją tej części cyklu prezentowanego osiągnięcia naukowego jest praca poświęcona przeglądowi światowej literatury w zakresie oznaczania hormonów steroidowych w moczu za pomocą nowoczesnych technik analitycznych [H4]. W artykule tym nie tylko wskazałam na znaczenie hormonów steroidowych jako biomarkerów stresu

oraz innych schorzeń wywołanych zaburzeniami wydzielania hormonów, ale przede wszystkim dokonałam przeglądu strategii analitycznych stosowanych w ich analizie. Był to doskonały punkt wyjścia w opracowywaniu własnych rozwiązań praktycznych. Ponadto, praca ta umożliwiła mi dokonanie wnikliwej oceny różnych strategii i metod stosowanych przez badaczy do oznaczania hormonów steroidowych, biorąc pod uwagę zarówno korzyści, jak i niedogodności związane z innymi technikami separacyjnymi takimi jak duża ilość odczynników organicznych potrzebnych do realizacji oznaczeń metodami HPLC, konieczność upochadniania analitów w przypadku techniki GC wynikającej z nielotności analitów i wrażliwości na podwyższoną temperaturę oraz wysokie koszty i często mała specyficzność w przypadku metod immunoenzymatycznych. Utwierdziło mnie to w przekonaniu o słuszności podjętego tematu w poszukiwaniu alternatywnej strategii z zastosowaniem technik opartych na MEKC.

Podsumowując, efektem tych badań jest opracowanie nowych procedur opartych na micelarnej elektrokinetycznej chromatografii (MEKC), które z powodzeniem zastosowano do pogłębionej analizy hormonów steroidowych w moczu. Tym samym opracowane procedury MEKC stały się dogodnym narzędziem w badaniach biomedycznych dostarczającym wielu cennych informacji o funkcjonowaniu organizmu oraz chorobach wywołanych zaburzeniami wydzielania hormonów steroidowych. Powyższe metody są szybkie, selektywne i bardziej przyjazne środowisku oraz relatywnie tanie w porównaniu z alternatywnymi technikami chromatograficznymi.

## II. *Opracowanie metody oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w tłuszczach w różnorodnych matrycach biologicznych z zastosowaniem MEKC lub MEEKC*

[H5] Ilona Olędzka\*, Piotr Kowalski, Tomasz Bączek, Beata Muszyńska-Furas, Jolanta Paradziej-Lukowicz, Marcin Taciak, Barbara Pastuszewska. **Determination of water soluble vitamins in laboratory animal feeds by micellar electrokinetic chromatography**, *Anal. Lett.* 2012, 45 (7), 689-701.

[H6] Ilona Olędzka, Piotr Kowalski, Alicja Bałuch, Tomasz Bączek\*, Jolanta Paradziej-Lukowicz, Marcin Taciak, Barbara Pastuszewska. **Quantification of the level of fat-soluble vitamins in feed based on the novel microemulsion electrokinetic chromatography (MEEKC) method**, *J. Sci. Food Agric.* 2014, 94 (3), 544-551.

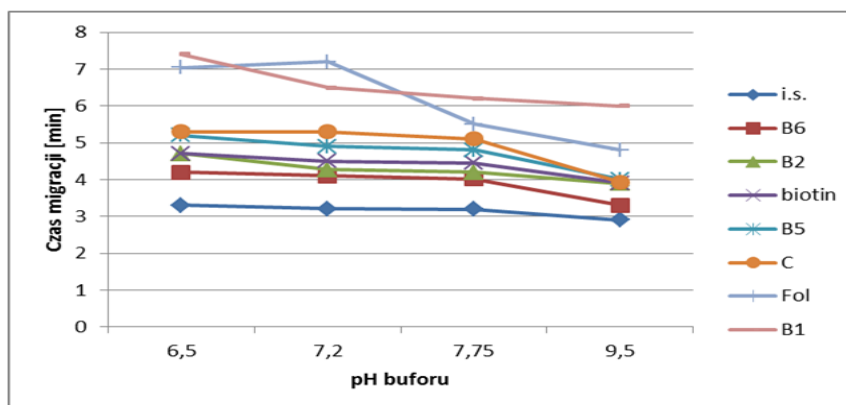
**[H7] Ilona Ołędzka\*, Katarzyna Kaźmierska, Alina Plenis, Barbara Kamińska, Tomasz Bączek. Capillary electromigration techniques as a tools for assessing the status of vitamins A, C and E in patients with cystic fibrosis, *J. Pharm Biomed. Anal.* 2015, 102, 45-53.**

Kolejnym istotnym nurtem badań, które prezentuję w niniejszym osiągnięciu naukowym było opracowanie alternatywnego narzędzia analitycznego opartego o techniki MEKC i MEEKC do oznaczeń witamin rozpuszczalnych w wodzie i rozpuszczalnych w tłuszczach w różnorodnych matrycach biologicznych takich jak: pasza dla zwierząt laboratoryjnych, mocz oraz surowica krwi ludzkiej [H5-H7].

Wprawdzie w literaturze światowej można znaleźć szereg doniesień dotyczących oznaczania witamin, jednakże najczęściej badania te koncentrują się na analizach w preparatach farmaceutycznych czy suplementach diety [36-39], podczas gdy literatura dotycząca oznaczania tych związków w matrycach biologicznych jest o wiele uboższa [40,41]. Głównym powodem takiego stanu jest fakt, że witaminy stanowią bogatą grupę substancji chemicznych różniących się strukturą oraz właściwościami chemicznymi, a ich najbardziej podstawowy podział na witaminy rozpuszczalne w wodzie i rozpuszczalne w tłuszczach jest bardzo uproszczony, gdyż klasyfikuje te anality tylko pod względem ich rozpuszczalności. Zatem, oznaczanie tak dużej i różnorodnej chemicznie grupy związków z matrycy biologicznej jest bardzo skomplikowane. Dlatego też podjęcie tego tematu w aspekcie zastosowania nowatorskich metodologii analitycznych opartych o MEKC wydało się być jak najbardziej zasadne, szczególnie biorąc pod uwagę fakt, iż technika ta jest przyjazna środowisku.

Dwie z prezentowanych prac wchodzących w skład przedstawionego osiągnięcia dotyczą opracowania warunków jednoczesnego oznaczania ośmiu witamin rozpuszczalnych w wodzie [H5] oraz czterech witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [H6] w paszach przeznaczonych dla zwierząt laboratoryjnych. Zasadność oceny zawartości witamin w paszach wynika z faktu, iż pasze na etapie produkcji poddawane są procesom sterylizacji w celu zapewnienia odpowiednich parametrów higienicznych, a proces ten może znacząco obniżać zawartość witamin. Wykorzystując zatem niezaprzeczalne zalety techniki MEKC, takie jak szybkość, selektywność, wysoką rozdzielczość oraz możliwość pracy z użyciem niewielkich ilości elektrolitów wodnych (około 2 ml buforu/dzień), zawierających tylko niewielkie dodatki rozpuszczalników organicznych, opracowałam metody oznaczania witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub> (biotyna), C, PP, oraz kwasu foliowego, a także witamin A, D, E i K we wspomnianych paszach dla zwierząt jako interesującą alternatywę dla metod chromatograficznych. Na wstępie badań

opisanych w pracy [H5] ustaliłam najbardziej optymalne warunki separacji elektroforetycznej rozpoczynając od dobrania parametrów buforu separacyjnego. Ze względu na duże zróżnicowanie analitów ten dobór był utrudniony, jednakże micelarno-elektrokinetyczna chromatografia wydawała się być w tym przypadku odpowiednią techniką separacyjną. Jest to związane z obecnością fazy pseudostacjonarnej, która pozwala nie tylko na oznaczanie cząsteczek obojętnych, ale także w znaczący sposób poprawia rozdzielczość analitów obdarzonych ładunkiem. W pierwszym etapie eksperymentów oceniłam wpływ pH elektrolitu w zakresie od 6,5 do 9,5 oraz stężenie buforu na efektywność separacji oznaczanych witamin. Zależność pomiędzy czasami migracji analitów a pH buforu separacyjnego przedstawia Rysunek 2 z którego wynika, iż najbardziej optymalne pH buforu, zapewniające najlepszą efektywność separacji wszystkich analitów, wynosi 7,75.



**Rysunek 2.** Wpływ pH buforu separacyjnego na czasy migracji analitów (na podstawie Rys. 2 z pracy [H5]).

Spośród badanych elektrolitów opartych na roztworach fosforanowych, boranowych lub fosforanowo-boranowych, bufor boranowy okazał się być najbardziej odpowiedni, gdyż generował niższe natężenie prądu, co ułatwiło zapewnienie stałych warunków temperaturowych oraz powtarzalność czasów migracji podczas analizy. Zaobserwowałam, że wzrost stężenia buforu poprawiał rozdzielczość sygnałów, ale po przekroczeniu pewnej wartości krytycznej, powodował znaczny wzrost natężenia prądu, wzrost wytwarzanego ciepła Joula i w efekcie prowadził do utraty rozdzielczości. Uwzględniając ten efekt, skład buforu boranowego dobrałam tak, aby stężenie boraksu generującego duże natężenie prądu, było niskie (5 mM) a kwasu borowego, który nie wpływa tak znacząco na wzrost natężenia prądu, wysokie (100 mM). Stwierdziłam

ponadto, że bufor ten zapewniał dobrą stabilność analitów i powtarzalność czasów migracji. W tak dobranych warunkach, witamina PP migrowała z prędkością równą wartości EOF, podczas gdy większość analizowanych witamin, które występowały w formie anionowej, migrowała wolniej niż EOF. Wśród nich, były witaminy B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>, które migrowały z podobną prędkością. Zjawisko to było wynikiem interakcji pomiędzy jonami boranowymi a cząsteczką pirydoksyny czy ugrupowaniem rybozy w ryboflawinie. Efektem był wzrost dysocjacji tych grup, co skutkowało większym ładunkiem ujemnym cząsteczek witamin B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub>, a to w konsekwencji wydłużyło ich czas migracji [42].

Ponadto, zbadalam wpływ dodatku SDS do buforu separacyjnego na rozdzielczość analitów, który oceniłam w zakresie od 0 (w układzie elektroforezy strefowej) do 75 mM. Wybór rodzaju surfaktanta wynikał także z wnikliwej analizy danych literaturowych, które wskazywały, że do rozdzielenia witamin w preparatach farmaceutycznych najczęściej stosowane były właśnie surfaktanty anionowe [43,44]. Jak wspomniałam, w przypadku buforu nie zawierającego SDS, realizowanego w układzie kapilarnej elektroforezy strefowej w buforze boranowym, witaminy B<sub>2</sub> i B<sub>6</sub> migrowały w tym samym czasie. Wraz ze wzrostem stężenia SDS w buforze obserwowałam poprawę rozdzielczości tych analitów, która osiągnęła wartości optymalne przy 30 mM stężeniu SDS w buforze. Jednakże dalszy wzrost stężenia SDS powodował pogorszenie rozdzielczości analitów i jednocześnie, w przypadku witaminy B<sub>1</sub>, znacząco wydłużał czas jej migracji. To zjawisko było prawdopodobnie spowodowane tworzeniem się par jonowych pomiędzy dodatnio naładowaną cząsteczką tiaminy a anionowym surfaktantem.

Ostatecznie optymalnym układem buforowym dla wspomnianej grupy witamin okazał się elektrolit złożony z 30 mM SDS, 100 mM kwasu borowego oraz 5 mM tetraboranu sodu.

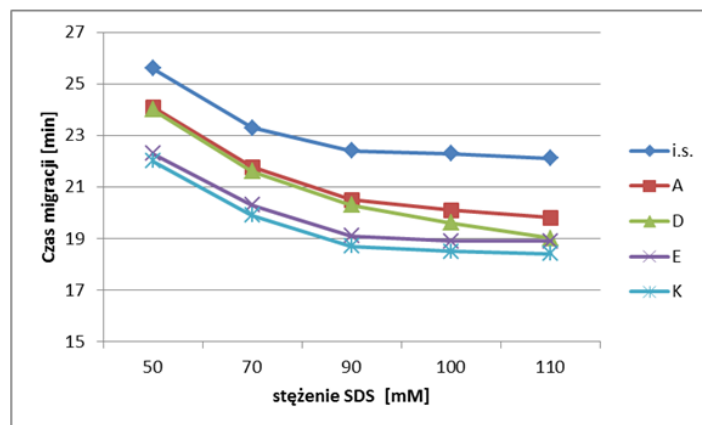
Druga praca dotyczyła oznaczania witamin tłuszczowych A, D, E i K we wspomnianych paszach przeznaczonych dla zwierząt laboratoryjnych [H6]. Ze względu na właściwości testowanych związków do ich analizy wybrałam odmianę techniki MEKC, a mianowicie mikroemulsyjną elektrokinetyczną chromatografię (MEEKC), która zachowując wszystkie zalety podstawowej odmiany, posiada jeszcze szerszy zakres zastosowań. Umożliwia bowiem jednoczesną analizę związków różniących się rozpuszczalnością w wodzie, posiadających ładunek elektryczny jak i tego ładunku pozbawionych. Te unikalne możliwości związane są z obecnością mikroemulsji jako buforu separacyjnego. Jak wspomniałam w części wstępnej, mikroemulsja jest klarownym roztworem, w którym rozproszone są nanometrowej wielkości cząsteczki oleju nie



mieszającego się z fazą wodną, stabilizowane przez dodatek surfaktantu oraz krótkołańcuchowego alkoholu (kosurfaktantu) a także modyfikatorów organicznych. W wyniku tego zmniejszone zostają napięcia na granicy faz, a dodatkowo zwiększają się możliwości separacyjne takiego roztworu poprzez różne oddziaływania z analitami.

W trakcie realizacji tych badań, największym wyzwaniem było opracowanie nie tylko składu mikroemulsji, ale także samej procedury jej przygotowania, gdyż obydwie te czynniki mają kluczowe znaczenie dla powodzenia analizy techniką MEEKC. Duże napięcia powierzchniowe pomiędzy fazą olejową i wodną, uniemożliwiający ich mieszanie się jest pokonywane poprzez dodatek surfaktantów dobrze rozpuszczających się w obu fazach. Napięcie powierzchniowe jest dodatkowo zmniejszane poprzez dodatek krótkołańcuchowego alkoholu jako kosurfaktanta. Co ważne, niewłaściwy skład jakościowo-ilościowy mikroemulsji prowadzi do szybkiego rozdzielenia się obu faz uniemożliwiając jej zastosowanie. Poważnym utrudnieniem jest to, że niewłaściwa kolejność przygotowania mikroemulsji powoduje powstanie nieklarownych, a więc nieprzydatnych analitycznie roztworów.

Ważnym etapem był także wybór surfaktanta, który wpływa nie tylko na zmniejszenie napięcia powierzchniowego pomiędzy obydwoma fazami, ale również nadaje ładunek kropelkom olejowym. Zastosowany w pracy SDS posiada 12 węglowy łańcuch alkilowy penetrujący do kropli oleju oraz ujemnie naładowane hydrofilowe grupy sulfonowe skierowane do fazy wodnej. Dane literaturowe wskazują przy tym, że wzrost długości łańcucha surfaktantu bardziej stabilizuje mikroemulsję, natomiast skrócenie długości zwiększa możliwość dyspersji fazy olejowej [12,13,45]. Dowiedziono również, że wyższe stężenie surfaktanta w większym stopniu stabilizuje bufor [13,45,46]. Zaobserwowałam, iż wyższe stężenie surfaktanta powoduje też wzrost gęstości ładunku na powierzchni fazy olejowej, a co się z tym wiąże, zwiększenie jej ruchliwości elektroforetycznej. W przypadku zastosowanego SDS, zbadałam jego wpływ na stabilność mikroemulsji w zakresie od 50 do 110 mM. Jak pokazują dane przedstawione na Rysunku 3, zastosowanie SDS w stężeniu 100 mM zapewniło wysoką efektywność separacji oznaczanych witamin. Ponadto, stabilność mikroemulsji była zachowana nawet przez kilka miesięcy. Przy niższych stężeniach surfaktanta efektywność separacji, jak i stabilność mikroemulsji znacząco się obniżała.



**Rysunek 3.** Zależność czasów migracji analitów od stężenia SDS w mikroemulsji. (na podstawie Rys. 1 z pracy [H6]).

Jako fazę olejową w MEEKC najczęściej stosuje się oktan, heptan lub heksan, podczas gdy dłuższe alkaniny nie sprzyjają powstawaniu stabilnych mikroemulsji [47,48]. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że najbardziej powtarzalne wyniki uzyskałam stosując oktan w stężeniu 8 g/kg. Wyższe stężenie powodowało zaburzenia podczas analizy i obniżenie intensywności sygnałów analitów. Dodatkowo zaobserwowałam, iż wzrost stężenia oktanu w mikroemulsji narzucał konieczność zwiększenia stężenia SDS, aby zapewnić stabilność buforu.

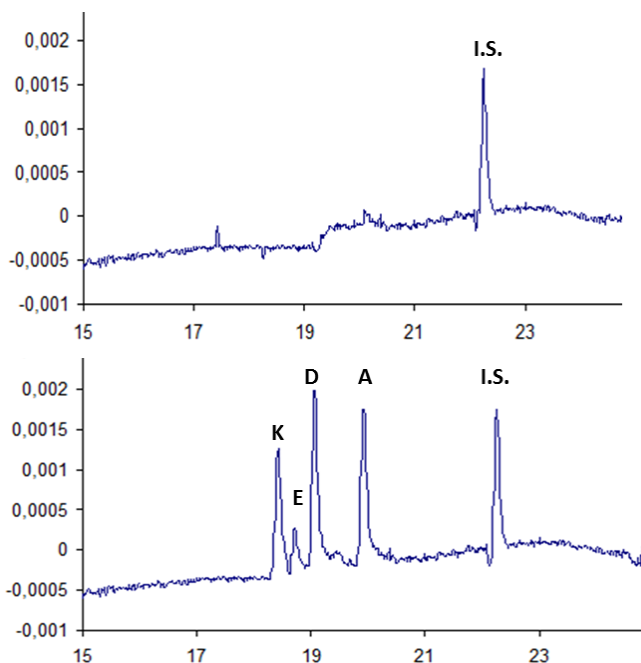
Kolejnym ważnym składnikiem mikroemulsji jest kosurfaktant, który zmniejsza napięcie międzyfazowe nawet do zera, dzięki czemu bardzo skutecznie wzrasta stabilność mikroemulsji. Jako kosurfaktanty stosuje się krótkołańcuchowe alkohole np. 1-butanol. Wyniki przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów potwierdziły, że czasy migracji analitów pozostawały niezmiennic, gdy stosowałam 1-butanol w stężeniu 60 g/kg, ale znaczny wzrost jego stężenia powodował skrócenie czasów migracji, co wynikało między innymi ze zmiany lepkości buforu.

Podczas komponowania mikroemulsji należy także uwzględnić fakt, iż silnie hydrofobowe substancje wnikają do wnętrza kropli olejowych nie wchodząc w interakcje z fazą wodną. Aby takie oddziaływania umożliwić i zapewnić rozdzielanie analitów, częstą praktyką jest dodatek modyfikatorów organicznych: metanolu, 2-propanolu, acetonitrylu czy tetrahydrofuranu [47].

Jako drugi kosurfaktant, zastosowałam 2-propanol ze względu na dobrą rozpuszczalność w fazie wodnej, jak i możliwość rozpuszczenia się w nim witamin A, D, E i K. Zbadałam jego wpływ na wydajność separacji w zakresie od 0 do 200 g/kg.

Najbardziej optymalne było stężenie 162 g/kg, podczas gdy przy stężeniu poniżej 150 g/kg następowało pogorszenie zarówno klarowności roztworu, jak i stabilności mikroemulsji. Ponadto zaobserwowałam, że wzrost stężenia 2-propanolu w buforze sprzyjał obniżeniu natężenia prądu ze 110  $\mu\text{A}$  (0 g/kg 2-propanolu) do 45  $\mu\text{A}$  (162 g/kg 2-propanolu). Jest to niezwykle korzystny efekt, ponieważ mniejsze natężenie prądu płynącego przez kapilarę zapewnia większą powtarzalność czasów migracji analitów.

Istotnym parametrem w MEEKC, podobnie jak w MEKC, jest pH fazy wodnej mikroemulsji. Najczęściej w MEEKC stosowane są bufony boranowe lub fosforanowe o niskiej sile jonowej w zakresie od 5 do 10 mM [49]. Taki elektrolit generuje niskie natężenie prądu oraz odpowiednią prędkość przepływu elektroosmotycznego. W badaniach zastosowałam bufor fosforanowy o pH 2,5, który ze względu na niskie pH generował małą prędkość EOF i wydłużał czasy migracji analitów, ale jednocześnie zapewniał odpowiednią rozdzielczość oznaczanych witamin. Odwrócenie polaryzacji elektrod z katodą przy wlocie do kapilary, w tym wypadku skróciło czas analizy witamin rozpuszczonych w kropelkach fazy olejowej mikroemulsji otoczonych ujemnie naładowanymi cząsteczkami SDS. Witaminy A, D, E i K zostały rozdzielane w kolejności malejącej hydrofobowości (Rys. 4).



**Rysunek 4.** Elektroferogram próbki paszy nie zawierającej witamin (A) oraz próbki paszy zawierającej badane witaminy (B) (na podstawie Rys. 2 z pracy [H6]).

*Warunki:* mikroemulsja: 2-propanol (16,2 g, w/w), 1-butanol (6,6 g, w/w), n-oktan (0,8 g, w/w), SDS (2,883 g, w/w) i 10 mM bufor fosforanowy doprowadzony do pH 2,5 za pomocą 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . napięcie: 12 kV; temperatura: 22°C; długość fali UV: 280 nm.

Jak wcześniej wspomniałam, wyniki przeprowadzonych badań dowiodły, że dla stabilności, klarowności i przydatności analitycznej mikroemulsji, niezwykle ważne było prawidłowe jej przygotowanie. Wprawdzie w dostępnej literaturze dostępne są dane dotyczące zastosowań MEEKC oraz składu mikroemulsji, to jednak brakuje doniesień lub wskazówek dotyczących samego procesu jej przygotowania. Eksperymentalnie ustaliłam, że najbardziej optymalna była następująca kolejność postępowania: odważenie odpowiednich ilości surfaktanta i zmieszanie z organiczną częścią mikroemulsji (n-oktan, 1-butanol i 2-propanol); powolne dodawanie wodnej części buforu o odpowiedniej sile jonowej i pH; poddanie całości sonifikacji przez około 30 min. Powyższe postępowanie w przypadku odpowiednio dobranego składu jakościowo-ilościowego zapewniało stabilność i klarowność otrzymanej mikroemulsji nawet przez kilka miesięcy.

Badania opisane w pracy [H7] były kontynuacją tematyki zastosowania MEKC do oznaczeń witamin, ale w tym przypadku, skupiłam się na ocenie poziomu witaminy C w moczu oraz witamin A i E w surowicy krwi dzieci chorych na mukowiscydozę. Moje zainteresowanie tym zagadnieniem wynikało z faktu, iż w dostępnej literaturze światowej brakowało doniesień o zastosowaniu MEKC jako narzędzia analitycznego w ocenie statusu witamin w przebiegu mukowiscydozy. Do oznaczania witaminy C w moczu zastosowałam wcześniej opracowaną metodę służącą analizie witamin rozpuszczalnych w wodzie w paszach dla zwierząt, opartą na buforze separacyjnym złożonym z 30 mM SDS, 100 mM kwasu bornego oraz 5 mM tetraboranu sodu.

Witaminy A i E w surowicy krwi oznaczyłam za pomocą techniki MEEKC. Podczas komponowania mikroemulsji zmodyfikowałam jej skład. Jako najbardziej odpowiednia okazała się mikroemulsja zawierająca jako część wodną 10 mM tetraboran sodu, natomiast część organiczna pozostała niezmienną. Ta niewielka zmiana spowodowała bardziej efektywne oddzielenie analitów od sygnałów pochodzących z surowicy krwi.

Zgodnie z tym, co wcześniej argumentowałam, optymalne rozdzielanie analitów techniką MEKC wymaga właściwego przygotowania próbek do analizy elektroforetycznej. Podczas opracowywania procedury ekstrakcji witamin rozpuszczalnych w wodzie z pasz dla zwierząt, największym problemem była duża ilość materii organicznej w matrycy, którą stanowiły białka, tłuszcze, skrobia i inne cukry, aminokwasy, wspomniane witaminy, a ponadto minerały i pierwiastki śladowe [H5]. Prawdopodobnie z tego powodu w literaturze naukowej mamy ograniczoną liczbę doniesień dotyczących oznaczania witamin w tak skomplikowanych matrycach [36,39]. W

początkowym etapie prac opisanych w publikacji [H5] zastosowałam ekstrakcję typu LLE, jednakże otrzymanywane ekstrakty nie były wystarczająco oczyszczone. Dopiero strategia oparta na SPE zapewniła wysoki stopień oczyszczenia próby oraz wysoką wydajność ekstrakcji analitów. Podczas optymalizacji procedury stosowałam kolumnienki do ekstrakcji typu C18, CN i HLB; a jako eluentu używałam octan etylu, metanol lub wodę dejonizowaną doprowadzoną do pH 4,47 za pomocą 0,01 M HCl. Najbardziej optymalne wyniki uzyskałam na sorbencie cyjanopropylenowym (CN), który pozwolił nie tylko na selektywną izolację oznaczanych witamin, ale także zapewnił największy ich odzysk (od 88,4% dla witaminy C do 94,6% dla witaminy B<sub>5</sub>).

Złożoność matrycy uwzględniłam także podczas ekstrakcji witamin tłuszczowych (A, D, E i K) z paszy, jednocześnie biorąc pod uwagę konieczność przeprowadzenia reakcji zmydlania [H6]. Reakcję tę stosuje się, gdy niepolarny analit znajduje się w niepolarniej matrycy. Przeprowadziłam reakcję zmydlania w warunkach alkalicznych stosując 40% etanolowy roztwór 0,1M NaOH. Następnie witaminy tłuszczowe ekstrahowałam za pomocą n-heksanu. Takie postępowanie zapewniło najwyższą wydajność ekstrakcji badanych witamin w zakresie od 89,7% dla witaminy K do 105,6% dla witaminy A.

Dodatkowym wyzwaniem analitycznym podczas realizacji pracy [H7] był fakt, iż zakresy fizjologiczne stężeń witaminy A, E i C w płynach ustrojowych (mocz, surowica) są na bardzo niskim poziomie, a dodatkowym utrudnieniem była niewielka objętość próby biologicznej, zwłaszcza surowicy krwi. Ponadto, ze specyfiki mukowiscydozy, wynikało, iż omawiane anality występują we krwi i w moczu w stężeniach znacznie poniżej stężeń fizjologicznych, a główną przyczyną tego stanu jest niedożywienie, u podłoża którego leżą zaburzone procesy trawienia oraz wchłaniania składników odżywczych [50,51]. W przypadku witaminy C, jej hydrofilowy charakter przyspiesza proces wydalania z moczem, a przy tym jej stężenie w tym materiale jest ściśle uzależnione od podaży w diecie. Tylko niewielkie ilości witaminy C są „przechowywane” w leukocytach i płytkach krwi [52]. Należy jednak zwrócić uwagę, że ważnym czynnikiem mogącym mieć wpływ na poziom witaminy C, zwłaszcza u chorych na mukowiscydozę, jest przewlekły stres oraz częste infekcje dróg oddechowych. Jednakże, badania w tym kierunku z zastosowaniem technik elektromigracyjnych nie były dotychczas przeprowadzone.

Aby określić poziom witaminy C u dzieci z mukowiscydozą ustaliłam warunki jej izolacji z moczu, która obejmowała wstępne odbiałczenie próby za pomocą acetonitrylu, a następnie zastosowanie ekstrakcji typu SPE. W tym przypadku, bardziej odpowiednie okazały się kolumnienki w wypełnieniu HLB, gdyż zapewniły większy odzysk analitu

(średnio 96,55%) oraz skuteczniejsze oczyszczenie matrycy z substancji balastowych. Jako eluentu użyłam wodę dejonizowaną doprowadzoną do pH 2,87 za pomocą 0,01M HCl, co znacznie skróciło czas przygotowania próby (pominięcie etapu odparowania rozpuszczalnika organicznego) oraz ograniczyło czas ekspozycji analitu na światło i podwyższoną temperaturę.

Optymalizując procedurę ekstrakcji witamin A i E z surowicy krwi uwzględniłam fakt, iż badane anality występują w tym materiale biologicznym na bardzo niskim poziomie, a ilość próbki jest ograniczona (1 ml). Z tego względu zastosowałam mikroekstrakcję dyspersyjną (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME). Jako rozpuszczalnika dyspergującego użyłam 1 ml acetonu oraz 100 µl dichlorometanu jako odczynnika ekstrahującego. W porównaniu do konwencjonalnej ekstrakcji LLE zastosowana w tym przypadku technika DLLME była nie tylko mniej czasochłonna, ale przede wszystkim wymagała mniejszych ilości kosztownych i toksycznych odczynników organicznych.

Wyniki badań potwierdziły także, że niska efektywność separacji była osiągnięta wówczas, gdy próbkę rozpuszczano w dejonizowanej wodzie lub rozcieńczonym buforze separacyjnym. Takie podejście jest powszechnie stosowane w przypadku MEKC. Jednakże ich użycie w MEEKC powoduje zaburzenia składu mikroemulsji wewnątrz kapilary i utrudnia lub całkowicie uniemożliwia separację. Najprawdopodobniej dochodzi wówczas do dezintegracji fazy olejowej i wodnej w buforze mikroemulsyjnym. Zatem, przed rozdzielaniem analitów metodą MEEKC, do rozpuszczenia próbek zastosowałam roztwory mikroemulsji [H6, H7].

Podsumowując wyniki badań opisanych w pracach [H5-H7] należy stwierdzić, że doprowadziły do opracowania skutecznych metodologii opartych na technice MEKC lub jej odmiany – MEEKC do analizy witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz rozpuszczalnych w tłuszczach w skomplikowanych matrycach biologicznych (pasze dla zwierząt, mocz czy surowica krwi). Pozwoliło to na ocenę zawartości witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub> (biotyna), C, PP, oraz kwasu foliowego a także witamin A, D, E i K w paszach poddanych procesom sterylizacji. Otrzymane wyniki umożliwiły nie tylko ocenę zawartości witamin, ale także ułatwiły wybór najbardziej optymalnych warunków sterylizacji takich jak: temperatura, ciśnienie i czas trwania autoklawowania. Uzyskane dane potwierdziły, że biotyna, witamina C oraz kwas foliowy są bardzo wrażliwe na wysoką temperaturę, podczas gdy witaminy z grupy B wykazywały dużo wyższą stabilność [H5]. Wyniki badań dowiodły także, że wśród witamin rozpuszczalnych w

tluszczach, witamina E jest odporna na sterylizację w wysokiej temperaturze, a jej poziom w paszy po autoklawowaniu był porównywalny z poziomem przed tym procesem [H6]. Dla witaminy A bardziej korzystne były warunki sterylizacji w temperaturze 121°C przez 20 min niż w 134°C przez 4 min. Odmienne rezultaty uzyskano dla witaminy D, która zachowuje dłuższą trwałość, gdy sterylizacja zachodzi krócej, ale w wyższej temperaturze (4 min, 134°C), niż gdy proces przebiega w niższej temperaturze, ale trwa dłużej (121°C, 20 min).

Wyniki pracy [H7] dowiodły, że opracowana metoda MEEKC umożliwiła ocenę statusu witamin A, C i E u dzieci chorych na mukowiscydozę, a ich poziom w przypadku witamin rozpuszczalnych w tłuszczach był niższy niż u dzieci zdrowych. W konsekwencji, stwarza to możliwość ustalenia odpowiedniego leczenia żywieniowego prowadzonego na zasadzie zindywidualizowanej terapii pod kontrolą lekarza i dietetyka, co pozwoli we właściwy sposób suplementować witaminy. Zatem opracowana metoda okazała się być pomocna w ocenie wskaźników stanu odżywienia chorych na mukowiscydozę.

### III. *Opracowanie metody oznaczania pochodnych benzodiazepiny w moczu ludzkim metodą FASS-MEKC poprzez optymalizację parametrów wpływających na separację pochodnych benzodiazepiny oraz optymalizację procedury ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej*

[H8] Ilona Olędzka\*, Zofia Kulińska, Adam Prahł, Tomasz Bączek. Simultaneous separation of eight benzodiazepines in human urine using field-amplified sample stacking micellar-electrokinetic chromatography, *J. Anal. Toxic.* 2015, 39(6), 436-443.

Benzodiazepiny (BDZs) posiadają podobne właściwości hydrofobowe i pozostają obojętne w szerokim zakresie pH, co sugeruje, że do ich analizy odpowiednią metodą separacyjną jest micelarno-elektrokinetyczna chromatografia. Jednakże, w światowej literaturze naukowej dotychczas opublikowane prace dotyczące oznaczania pochodnych benzodiazepiny metodami elektroforetycznymi nie wykazują odpowiedniej czułości niezbędnej do ich oceny w realnych próbach moczu [53,54]. Podjęcie tego tematu wynikało także z faktu, iż ta grupa leków jest często stosowana w praktyce klinicznej u pacjentów w lęku ostrym lub przewlekłym, w premedykacji, w padaczce oraz w bezsenności. Niekorzystnym zjawiskiem jest przy tym rosnące zjawisko ich nadużywania,

które prowadzi do uzależnienia psychicznego i fizycznego. Niestety, głównym powodem tych uzależnień są pozamedyczne zastosowania pochodnych benzodiazepiny, gdy w celu wzmocnienia efektu euforyzującego są one łączone z alkoholem lub innymi lekami hamującymi ośrodkowy układ nerwowy. W związku z powyższym Komisja ds. Narkomanii powołana przez ONZ wprowadziła konieczność kontroli najczęściej stosowanych pochodnych, a laboratoria zostały zobowiązane do opracowywania wiarygodnych i szybkich metod analitycznych umożliwiających oznaczanie tych leków [55,56].

Wspomniane powyżej argumenty skłoniły mnie do opracowania metody MEKC wspomaganej techniką wzmacniania sygnału *on-line* w kapilarze opartej o spiętrzanie ze wzmocnieniem pola (ang. *Field-amplified sample stacking*, FASS) do jednoczesnej analizy 9 pochodnych benzodiazepiny (BDZs) w próbkach moczu [H8]. W tym celu opracowałam i zoptymalizowałam metodę rozdzielania nitrazepamu, klonazepamu, chlordiazepoksydu, estazolamu, temazepamu, lorazepamu, lormetazepamu, midazolamu i medazepamu, a także opracowałam warunki wydajnej metody izolacji tych analitów z matrycy biologicznej.

Na wstępie, zoptymalizowałam parametry rozdzielania elektroforetycznego mając na uwadze właściwości fizyko-chemiczne analitów. Jako elektrolit separacyjny wyselekcjonowałam bufor boranowy i fosforanowy z dodatkiem surfaktanta SDS i metanolu. Metanol bezpośrednio wpływał na zmianę lepkości buforu i zapobiegał adsorpcji analitów na ściankach kapilary oraz pośrednio poprawiał rozpuszczalność analitów o charakterze hydrofobowym. Jego wpływ na efektywność separacji zbadalam w zakresie od 0 do 20% (v/v), przy czym najbardziej optymalne rozdzielanie wszystkich analitów osiągnęłam przy zastosowaniu 15% (v/v) metanolu w buforze separacyjnym. Wpływ stężenia SDS w opracowywanym buforze separacyjnym zbadalam w zakresie od 10 do 150 mM. Zaobserwowałam, że zbyt niskie stężenie SDS poniżej 30 mM powodowało poszerzenie pików i obniżenie rozdzielczości, natomiast wzrost stężenia powyżej 50 mM SDS skutkowałam wzrostem natężenia prądu, co pociągało konieczność usuwania ciepła Joula. W efekcie, następowało pogorszenie powtarzalności czasów migracji a „piki” były niesymetryczne. Stężenie 30 mM SDS w elektrolicie zapewniło optymalne warunki separacji wszystkich analitów.

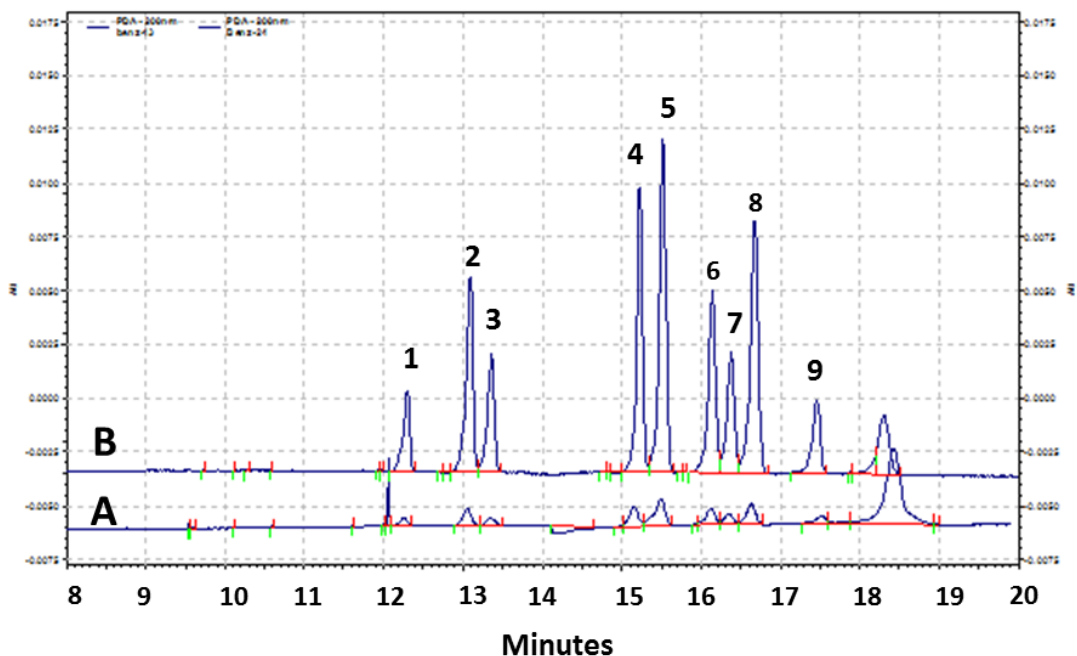
Istotnym parametrem decydującym o szybkości EOF i pośrednio o czasach migracji analitów jest także pH buforu separacyjnego. Zaobserwowałam, że w przypadku zastosowania buforów o pH w zakresie 6-8, sygnały pochodzące od analitów nakładały się



na siebie (słaba rozdzielczość). Podobny efekt obserwowałam gdy wzrosło stężenie boraksu w buforze separacyjnym z 10 do 20 mM. Wzrost siły jonowej buforu powodował wówczas obniżenie prędkości EOF. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, iż bufor boranowy o pH 8,8 złożony z 10 mM boraksu, 30 mM SDS oraz 15% (v/v) metanolu jest najbardziej optymalny i stanowi kompromis pomiędzy dobrą rozdzielczością a czasem analizy.

Jak wspomniałam, odpowiednie rozpuszczenie próbki przed analizą elektroforetyczną gwarantuje prawidłowy przebieg separacji. Powszechną praktyką w elektroforezie jest rozpuszczenie próbki w dejonizowanej wodzie lub rozcieńczonym buforze separacyjnym, dlatego w początkowym etapie eksperymentów próbki były rozpuszczane w wodzie lub 2 mM boraksie. Jednakże uzyskane wyniki nie zapewniły odpowiedniej czułości pozwalającej na ocenę realnych stężeń badanych analitów w moczu. W związku z tym, wydłużyłam czas dozowania próbki z 5 do 15 s, tak aby wprowadzić większą objętość próbki do kapilary, co często poprawia intensywność sygnału i pomaga zwiększyć czułość metody. Wprawdzie intensywność sygnału przy 15 s dozowaniu próbki wzrosła, ale nadal była niewystarczająca, podczas gdy dalsze wydłużanie czasu wprowadzania próbki prowadziło do przeładowania kapilary, co pogarszało efektywność separacji. W związku z tym, dla zwiększenia czułości metody zastosowałam jedną z technik wzmacniania sygnału *on-line* tzw. spiętrzanie ze wzmocnieniem pola. Mechanizm tego zjawiska polega na zastosowaniu dwóch rodzajów buforów różniących się siłą jonową, którymi są bufor do próbek (ang. *sample buffer*), posiadający niską przewodność oraz bufor separacyjny o wysokiej przewodności [57,58]. W sytuacji, gdy próbka jest rozpuszczona w buforze o niskiej sile jonowej, a następnie jest wprowadzona do kapilary wypełnionej buforem separacyjnym o wysokiej sile jonowej, pod wpływem przyłożonego napięcia dochodzi do generowania silnego pola elektrycznego w strefie próbki i szybkiej migracji analitów. Ta szybka migracja ulega gwałtownemu wyhamowaniu na granicy obu buforów, gdzie jednocześnie dochodzi do spiętrzenia analitów (ang. *stacking*). Jednakże ta zależność jest spełniona tylko dla małych objętości próbek czyli czas dozowania próbki o niskiej przewodności nie powinien być zbyt długi. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż 15-sekundowy nastrzyk próby do kapilary okazał się dobrym kompromisem pomiędzy wydajnością separacji a wzmocnieniem sygnału, gdyż dalsze wydłużanie czasu nastrzyku prowadziło do zaburzeń przewodności prądu i pogarszało efektywność separacji. Jak podają dane literaturowe, ten sposób wzmocnienia sygnału pozwala na poprawę czułości metody od 10 do nawet 1000 razy

[59]. W przedstawionej pracy, w wyniku zastosowania wzmocnienia sygnału metodą FASS uzyskałam wzmocnienie sygnału od 50 do 100 razy w stosunku do metody MEKC bez FASS co umożliwiło analizę wspomnianych pochodnych benzodiazepiny w realnych próbach moczu (Rys. 5).



**Rysunek 5.** Elektroferogramy otrzymane podczas separacji 9 pochodnych benzodiazepiny metodą MEKC (A) oraz FASS-MEKC (B) (na podstawie Rysunku 1 z pracy [H8]).

Anality: 1 – nitrazepam (I.S.), 2 – klonazepam, 3 – chlordiazepoksyd, 4 – estazolam, 5 – temazepam, 6 – lorazepam, 7 – lormetazepam, 8 – midazolam, 9 – medazepam.

Warunki: detektor DAD 200 nm, kapilara krzemionkowa (50cm × 75µm I.D.), temp. 22 °C, napięcie 23 kV, nastrzyk pneumatyczny 15 s, bufor separacyjny złożony z 30 mM SDS, 10 mM Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> i 15% (v/v) MeOH

Kluczowym elementem przeprowadzonych eksperymentów, poza optymalizacją metody separacyjnej, było także opracowanie warunków izolacji pochodnych BDZs z próbek moczu. Zastosowaną w tym celu procedurę oparłam na mikroekstrakcji dyspersyjnej (ang. *dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME), która ze względu na niewielkie zużycie odczynników oraz szybki czas wykonania stanowi doskonałą alternatywę dla LLE [60,61]. A ponadto technika ta daje możliwość jednoczesnego zateżenia analitów, wyizolowanych z większej objętości próbki moczu (3 ml). Zoptymalizowałam także inne parametry wpływające na proces ekstrakcji takie jak: rodzaj i objętość czynnika dyspergującego i ekstrahującego, czas ekstrakcji czy dodatkowe etapy zwiększające stopień oczyszczenia matrycy z substancji balastowych. Stosując 1 ml etanolu jako czynnik dyspergujący oraz 500 µl dichlorometanu jako czynnik ekstrahujący oraz wprowadzając dodatkowy etap wirowania próby po jej rozmrożeniu,

uzyskałam odpowiednie oczyszczenie matrycy z substancji balastowych oraz dobrą wydajność ekstrakcji analitów z moczu w zakresie od  $90,6 \pm 5,7\%$  dla temazepamu do  $94,2 \pm 3,5\%$  dla midazolamu. Aspekt praktyczny opracowanej metody potwierdziłam poprzez jej zastosowanie do oznaczenia zawartości wybranych pochodnych benzodiazepiny (klonazepam, estazolam i lorazepam) w realnych próbkach moczu pochodzących od osób przyjmujących leki z grupy anksjolityków pochodnych benzodiazepiny. Uzyskane rezultaty potwierdziły, iż opracowana metodyka FASS-MEKC może być użytecznym narzędziem zarówno w kontroli stosowania leków, jak i w przypadku monitorowania nadużycia czy przebiegu procesu leczenia osób uzależnionych w ośrodkach detoksykacyjnych.

## PODSUMOWANIE

Głównym wynikiem badań, które zostały opisane w pracach wchodzących w skład prezentowanego osiągnięcia naukowego [**H1-H8**], było szczegółowe wyjaśnienie złożoności mechanizmów, które zachodzą w kapilarze, a także określenia wpływu modyfikacji parametrów analizy na jakość rozdzieleń elektroforetycznych. Wiedza i zdobyte doświadczenie w tym zakresie pozwoliły na opracowanie metodyk opartych na MEKC i MEEKC do oznaczeń hormonów sterydowych, witamin rozpuszczalnych w wodzie i w tłuszczach oraz leków (pochodnych benzodiazepiny) w materiale biologicznym. Podejściem nowatorskim tych prac było więc wykorzystanie na szeroką skalę technik elektromigracyjnych do analizy substancji biologiczne czynnych, co umożliwiało oznaczanie tych analitów na poziomie wymaganym dla danej aplikacji klinicznej bądź farmaceutycznej przy użyciu tradycyjnego i popularnego w laboratoriach badawczych detektora UV-Vis. Tym samym, główny mankament technik elektroforetycznych związany z ich niską czułością został do pewnego stopnia przezwyciężony. Ponadto, opracowane metodologie wsparłam zoptymalizowanymi procedurami izolacji analitów z matrycy biologicznej co w efekcie zaowocowało powstaniem efektywnych narzędzi bioanalitycznych w analizie prób biologicznych, czyniąc techniki MEKC, które są przyjazne środowisku, bardziej konkurencyjnymi względem metod chromatograficznych. Ich rzeczywiste możliwości aplikacyjne w praktyce farmaceutycznej i klinicznej potwierdziłam poprzez przeprowadzenie szeregu analiz rzeczywistych próbek biologicznych o zróżnicowanym pochodzeniu.

W zakresie zadań badawczych objętych osiągnięciem naukowym i obejmujących ocenę wpływu parametrów warunkujących efektywność analiz opartych o micelarno-elektrokinetyczną chromatografię:

1. Opracowałam nowatorskie podejście do analizy szerokiego panelu hormonów sterydowych z moczu ludzkiego wsparte optymalizacją ekstrakcji analitów z matrycy biologicznej oraz oceniłam wpływ parametrów.
2. Potwierdziłam aplikacyjność opracowanych metodologii w praktyce klinicznej poprzez ich zastosowanie w badaniach dotyczących oceny przydatności oznaczeń glikokortykosteroidów jako wskaźników narażenia na stres, kontroli zaburzeń wydzielania hormonów płciowych oraz w badaniach antydopingowych u osób uprawiających sporty siłowe.
3. Opracowałam nowatorską metodę oznaczania witamin rozpuszczalnych w wodzie wraz z optymalizacją procedury ekstrakcji analitów ze złożonej matrycy jaką jest pasza dla zwierząt. Ponadto, dzięki opracowanej metodzie wykonałam badania pozwalające ocenić trwałość witamin B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>7</sub> (biotyna), C, PP, oraz kwasu foliowego, podczas poddawania pasz procesowi sterylizacji.
4. Opracowałam nowatorską metodę opartą na mikroemulsyjno-elektrokinetycznej chromatografii (będącej odmianą techniki MEKC) do oznaczania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach w paszach dla zwierząt w celu oceny wpływu procesu sterylizacji na ich trwałość. Ponadto ustaliłam najbardziej optymalne warunki izolacji witamin A, D, E i K z matrycy biologicznej.
5. Z uwagi na brak doniesień w dostępnej literaturze światowej o zastosowaniu MEKC jako narzędzia analitycznego w ocenie statusu witamin u chorych na mukowiscydozę przeprowadziłam nowatorskie badania dotyczące opracowania metody oznaczania witaminy C w moczu, a także potwierdziłam aplikacyjność tej metody w analizie realnych prób moczu pacjentów.
6. Przeprowadziłam pionierskie eksperymenty mające na celu opracowanie metody elektroforetycznej separacji i oznaczenia ilościowego witamin A i E w surowicy krwi dzieci chorujących na mukowiscydozę. Uzyskane wyniki badań wsparte analizą statystyczną (testy parametryczne, testy nieparametryczne i metody chemometryczne) potwierdziły statystycznie istotną różnicę stężeń witaminy E u dzieci z mukowiscydozą i dzieci zdrowych, podczas gdy poziom witaminy A był obniżony, ale bez wykazania jej statystycznie istotnej różnicy względem dzieci zdrowych. Zatem, opracowana metoda okazała się pomocna w ocenie wskaźników stanu odżywienia

chorych na mukowiscydozę. Ponadto, wyniki badań wskazały potrzebę ustalenia odpowiedniego leczenia żywieniowego dzieci z mukowiscydozą prowadzonego pod kontrolą lekarza i dietetyka, które umożliwi ich właściwe suplementowanie.

7. Opracowałam nowatorską metodę MEKC wspomaganą techniką wzmacniania sygnału *on-line* w kapilarze opartą na spiętrzaniu analitów ze wzmocnieniem pola, do jednoczesnej analizy 9 pochodnych benzodiazepiny w próbach moczu. Uzyskane rezultaty potwierdziły przydatność opracowanej metody jako użytecznego narzędzia zarówno w kontroli stosowania leków, jak i w przypadku monitorowania nadużycia czy przebiegu procesu leczenia w ośrodkach detoksykacyjnych.

Zatem, wymiernym efektem przeprowadzonych badań wyjaśniających wpływ wielu parametrów na efektywność rozdzieleń elektroforetycznych w technice MEKC, było opracowanie nowatorskich, specyficznych oraz jednocześnie tanich, czułych i szybkich metod oznaczania omawianych analitów w oparciu o nowoczesne kapilarne techniki elektromigracyjne. Niezależnie od podjętego zadania badawczego wykazałam, że metody te stanowią interesującą alternatywę dla technik chromatograficznych. Niewątpliwym efektem wynikającym z realizacji przedstawionego osiągnięcia naukowego jest także jego wkład w poszerzeniu wiedzy na temat zastosowań kapilarnych technik elektromigracyjnych, w szczególności micelarno-elektrokinetycznej chromatografii (MEKC), podczas analizy substancji leczniczych oraz substancji endogennych w matrycach biologicznych.

## UWAGI KOŃCOWE

Prace naukowo-badawcze, stanowiące monotematyczny cykl publikacji były finansowane w ramach działalności statutowej Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (GUMed) a także współfinansowane przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach realizacji projektu N N405 024340, Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu 2011/03/B/NZ7/02333 oraz w ramach dotacji dla Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego (KNOW) na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Ze względu na interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań, który wymagał łączenia wiedzy i umiejętności specjalistów z różnych dziedzin, współpracowałam z

różnymi ośrodkami badawczymi. W zakresie badań dotyczących oznaczania witamin w paszach dla zwierząt laboratoryjnych współpracowałam z prof. dr hab. Barbarą Pastuszewską z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego w Jabłonnej Polskiej Akademii Nauk, oraz z dr Jolantą Paradziej-Łukowicz z Trójmiejskiej Akademickiej Zwierzętarni Doświadczalnej - Centrum Badawczo-Uslugowe Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Natomiast w zakresie oceny statusu odżywienia dzieci chorych na mukowiscydozę współpracowałam z prof. dr hab. Barbarą Kamińską oraz z lek. med. Katarzyną Kaźmierską z Kliniki Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci, GUMed. Podczas realizacji doświadczeń związanych z opracowaniem metody oznaczania pochodnych benzodiazepiny w moczu współpracowałam z prof. dr hab. Adamem Prahlem z Instytutu Syntez Organicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Anal. Chem.*, 56, 1984, 111-113.
- [2] H. Nishi, S. Terabe, Micellar electrokinetic chromatography. Perspectives in drug analysis, *J. Chromatogr. A*, 735, 1996, 3-27.
- [3] S.E. Deeb, M.A. Iriban, R. Gust, MEKC as a powerful growing analytical technique, *Electrophoresis*, 32, 2011, 166-183.
- [4] B. Buszewski, E. Dziubakiewicz, M. Szumski, Techniki elektromigracyjne. Teoria i praktyka. Wydawnictwo Malamut, Warszawa 2012
- [5] P.D. Grossman, J.C. Colburn, Capillary Electrophoresis – Theory and Practice, Academic Press INC., 1992
- [6] B.A. Williams, G. Vigh, Determination of accurate electroosmotic mobility and analyte effective mobility values in the presence of charged interacting agents in capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 69 (21), 1997, 4445-4451.
- [7] M.G. Khaledi, Micelles as separation media in high-performance liquid chromatography and high-performance capillary electrophoresis: overview and perspective, *J. Chromatogr. A*, 780, 1997, 3-40.
- [8] M.L. Riekkola, S.K. Wiedmer, I.E. Valko, H. Sirén, Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and non-aqueous media, *J. Chromatogr. A*, 792, 1997, 13-35.
- [9] M. Silva, Micellar electrokinetic chromatography: A review of metodological and instrumental innovations focusing on practical aspects, *Electrophoresis*, 34, 2013, 141-158.
- [10] S. Sharma, S. Kori, A. Parmar, Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices, *Food Chem.*, 185, 2015, 284-288.
- [11] I. Ullah, M.K. Baloch, I. Ullah, M. Mustaqeem, Enhancement in aqueous solubility of mefenamic acid using micellar solutions of various surfactants, *J. Solution Chem.*, 43, 2014, 1360-1373.

- [12] M.F. Miola, M.J. Snowden, K.D. Altria, The use of microemulsion electrokinetic chromatography in pharmaceutical analysis, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18, 1998, 785-797.
- [13] K.D Altria, Background theory and applications of microemulsion electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, 892 (2000), 171-186
- [14] R. Pomponio, R. Gotti, J. Fiori, V. Cavrini. Microemulsion electrokinetic chromatography of corticosteroids effect of surfactants and cyclodextrins on the separation selectivity, *J. Chromatogr. A.*, 1081, 2005, 24-30.
- [15] R. Koike, F. Kitagawa, K. Otsuka, Separation of fatty alcohol ethoxylates by capillary zone electrophoresis and electrokinetic chromatography, *J. Sep. Sci.*, 32, 2009, 399-407.
- [16] S. Terabe, Micellar electrokinetic chromatography for high-performance analytical separation, *The Chemical Record*, 8, 2008, 291-301.
- [17] S. Orlandini, R. Gotti, S. Furlanetto, Multivariate optimization of capillary electrophoresis methods: A critical review, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 87, 2013, 290-307.
- [18] L. Crapo, Cushing's syndrome: a review of diagnostic tests, *Metabolism*, 28, 1979, 955-977.
- [19] D.H. Hellhammer, S. Wüst, B.M. Kudielka, Salivary cortisol as a biomarker in stress research, *Psychoneuroendocrinology*, 34, 2009, 163-171.
- [20] R.C. Andrews, B.R. Walker, Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets, *Clin. Sci.*, 96, 1999, 13-23.
- [21] D. Tiosano, I. Eisentein, D. Militianu, G.P. Chrousos and Z. Hochberg, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity in hypothalamic obesity, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 2003, 379-384.
- [22] F. Hammer and P.M. Stewart, Cortisol metabolism in hypertension, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, 20, 2006, 337-353.
- [23] M. Homma, A. Tanaka, K. Hino, H. Takamura, T. Hirano, K. Oka, M. Kanazawa, T. Miwa, Y. Notoya, T. Nutsuma and T. Hayashi, Assessing systemic 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase with serum cortisone/cortisol ratios in healthy subjects and patients with diabetes mellitus and chronic renal failure, *Metabolism*, 50, 2001, 801-804.
- [24] M.M. Kushnir, A.L. Rockwood, W.L. Roberts, B. Yue., J. Bergquist, A.W. Meikle, Liquid chromatography tandem mass spectrometry for analysis of steroids in clinical laboratories, *Clin. Biochem.*, 44, 2011, 77-88.
- [25] G.J. Trout, R. Kazlauskas, Sports drug testing-an analyst's perspective, *Chem. Soc. Rev.* 2004, 33, 1-13.
- [26] The 2005 Prohibited List Published by the World Anti-Doping Agency. [www.wada-ama.org/Documents/World\\_Anti-Doping\\_Program/WADP-Prohibited\\_list/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2010\\_EN.pdf](http://www.wada-ama.org/Documents/World_Anti-Doping_Program/WADP-Prohibited_list/WADA_Prohibited_List_2010_EN.pdf)
- [27] L.A. Kartsova, E.A. Bessonova, Determination of steroids in biological samples by micellar electrokinetic chromatography, *J. Anal. Chem.*, 62, 2007, 68-75.
- [28] L. A. Kartsova, G. Strelnikova, Determination of Endo- and Exogenous Corticosteroids by Cyclodextrin-Modified Micellar Electrokinetic Chromatography with the Use of On-Line Preconcentration *J. Anal. Chem.*, 62 (8), 2007, 716-720.
- [29] 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(3-4), 1998, 659-62.

- [30] O.A. Sharef, J. Feely, P.V. Kavanagh, K.R. Scott, S.C. Sharma, An HPLC method for the determination of the free cortisol/cortisone ratio in human urine. *Biomed. Chromatogr.*, 21, 2007, 1201–1206.
- [31] R. Gatti, G. Antonelli, M. Prearo, P. Spinella, E. Cappellin, E.F. De Palo, Cortisol assays diagnostic laboratory procedures in human biological fluids, *Clin. Biochem.*, 42, 2009, 1205-1217.
- [32] S. AbuRuz, J. Millership, L. Heaney, J. McElney, Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges. *J. Chromatogr. B*, 798, 2003, 193–201.
- [33] H.J. Cho, J.D. Kim, W.Y. Lee, B.C. Chung, M.H. Choi, Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 632, 2009, 101–108.
- [34] A. Levine, O. Zagoory-Sharon, R. Feldman, J.G. Lewis, A. Weller, Measuring cortisol in human psychological studies. *Physiology and Behavior*, 90, 2007, 43-53.
- [35] D.J.-F. De Quervain, J. Margraf, Glucocorticoids for the treatment of post-traumatic stress disorder and phobias: A novel therapeutic approach. *European Journal of Pharmacology*, 583, 2008, 365-371.
- [36] L.S. Anisimova, E.V. Mikheeva, V.F. Slipchenko, Voltammetric determination of riboflavin in vitaminized supplements and feeds. *J. Anal. Chem.* 56 (7), 2001, 658-662.
- [37] R.H.F. Cheung, P.J. Marriott, D.M. Small, CE methods applied to the analysis of micronutrients in foods, *Electrophoresis*, 28, 2007, 3390-413.
- [38] M.S. Aurora-Prado, C.A. Silva, M.F.M. Tavares, K.D. Altria, Rapid Determination of Water-Soluble and Fat-Soluble Vitamins in Commercial Formulations by MEEKC, *Chromatogr.* 72, 2010, 687-694.
- [39] A.O. Rudenko, L.A. Kartsova, Determination of water-soluble vitamin B and vitamin C in combined feed, premixes, and biologically active supplements by reversed-phase HPLC. *J. Anal. Chem.*, 65(1), 2010, 71-76.
- [40] M.S. Aurora-Prado, C.A. Silva, M.F.M. Tavares, K.D. Altria, Rapid Determination of Water-Soluble and Fat-Soluble Vitamins in Commercial Formulations by MEEKC, *Chromatogr.* 72, 2010, 687-694.
- [41] M.G. Giorgi, K. Howland, C. Martin, A.B. Bonner, A Novel HPLC Method for the Concurrent Analysis and Quantitation of Seven Water-Soluble Vitamins in Biological Fluids (Plasma and Urine): A Validation Study and Application. *Sci. World J.* (2012) Article ID 359721 doi:10.1100/2012/359721
- [42] L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, Ph. Hubert, J. Crommen, Determination of six water-soluble vitamins in a pharmaceutical formulation by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15, 1997, 1113-1123.
- [43] M. M. Delgado-Zamarreno, I. Gonzalez-Maza, A. Sanchez-Perez, R. Carabias-Martinez, Separation and simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble vitamins by electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A* 953, 2002, 257-262.
- [44] R. Gadzala-Kopciuch, M. Szumski, B. Buszewski, Determination of biotin in pharmaceutical preparation by means of HPLC and/or MEKC. *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Tech.* 26(2), 2003, 195-205.
- [45] K.D. Altria, P.E. Mahuzier, B.J. Clark, Background and operating parameters in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 24, 2003, 315-324.
- [46] Ch.W. Klampfl, Solvent effects in microemulsion electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 24, 2003, 1537-1543.



- [47] M. Bustamante-Rangel, M.M. Delgado-Zamarreño, A. Sánchez-Pérez, R. Carabias-Martinez, Microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of retinol, cholecalciferol,  $\delta$ -tocopherol and  $\alpha$ -tocopherol. *J Chromatogr A* 1125, 2006, 270-273.
- [48] M. Broderick, S. Donegan, J. Power, K. Altria, Optimisation and use of water-in-oil MEEKC in pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 37, 2005, 877-884.
- [49] P. Puig, F. Borrull, C. Aguilar, M. Calull, Sample stacking for the analysis of penicillins by microemulsion electrokinetic capillary chromatography. *J Chromatogr B* 831, 2006, 196-204.
- [50] J. Walkowiak, J. Przysławski, Five-year prospective analysis of dietary intake and clinical status in malnourished cystic fibrosis patients. *J. Hum. Nutr. Diet.*, 16, 2003, 225-231.
- [51] M. Szczepanik, M. Krawczyński, W. Cichy, Nutritional status of children with cystic fibrosis of the Wielkopolska Province. *Ped. Wsp. Gastr. Hep. i Żyw. Dz.*, 6, 2004, 47-51.
- [52] T. Fukuwatari, E. Yoshida, K. Takahashi, K. Shibata, Effect of fasting on the urinary excretion of water-soluble vitamins in humans and rats, *J. Nutr. Sci. Vit.* 56, 2010, 19-26.
- [53] H.L. Su, W.C. Kao, K.W. Lin, C.Y. Lee, Y.Z. Hsieh, 1-butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis. *J.Chromatogr. A*, 1217, 2010, 2973-2979.
- [54] Y.H. Ho, C.C. Wang, Y.T. Hsiao, W.K. Ko, S.M. Wu, Analysis of ten abused drugs in urine by large volume sample stacking-sweeping capillary electrophoresis with an experimental design strategy. *Journal of Chromatography A*, 1295, 2013, 136-141.
- [55] P.G.N. Mengue, B. Abdous, D. Berbiche, M. Preville, P. Voyer Impact benzodiazepine dependence on the use of health services: Senior' health study. *Geriatric Et Psychologie Neuropsychiatrie De Vieillessement*, 11, 2013, 229-236.
- [56] P. Nubukpo, J.P. Clement, Medical drug abuse and aging. *Geriatric Et Psychologie Neuropsychiatrie De Vieillessement*, 11, 2013, 305-315.
- [57] S.L. Simpson Jr., J.P. Quirino, S. Terabe, On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis. Fundamentals and applications, *J. Chromatogr. A.*, 1184, 2008, 504-541.
- [58] Sz. Dziomba, P. Kowalski, T. Bączek, Field-amplified sample stacking-sweeping of vitamins B determination in capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. A*, 1267, 2012, 224-230.
- [59] J.B. Kim, J.P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, On-line sample concentration in micellar electrokinetic chromatography using cationic surfactants. *J.Chromatogr. A*, 916, 2001, 123-130.
- [60] U. Alshana, N.G. Goger, N. Ertas, Dispersive liquid-liquid microextraction combined with field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk and dairy products. *Food Chemistry*, 138, 2013, 890-897.
- [61] C. Almeida, J.O. Fernandes, S.C. Cunha, A novel dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method for the determination of eighteen biogenic amines in beer. *Food Control*, 25, 2012, 380-388.

## 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

### **5.1. Aktywność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

W październiku 1995 roku rozpoczęłam pracę w Katedrze i Zakładzie Chemii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdański Uniwersytet Medyczny) pod kierunkiem prof. dr. hab. Henryka Lamparczyka, który dwa lata wcześniej rozpoczął, jako jedno z pierwszych w Polsce, badania z zastosowaniem elektroforezy kapilarnej. Swoim entuzjazmem i fascynacją tą techniką zachęcił mnie do zainteresowania się tą dziedziną nauki. Podjęta praca pozwoliła mi na opanowanie warsztatu analitycznego w zakresie technik elektromigracyjnych. W ramach swojej działalności naukowej realizowałam na tym polu szereg projektów dotyczących badań pozostałości leków stosowanych w weterynarii w żywności pochodzenia zwierzęcego (amoksycyklina, doksycyklina, streptomycyna, iwermektyna, fenikole oraz nifursol), a także w badaniach biodostępności i biorównoważności preparatów farmaceutycznych zawierających m.in. iwermektynę. Badania te były prowadzone we współpracy z dr. Piotrem Okoniewskim (dyrektorem firmy „Vetos-Pharma” w Bielawie) oraz z prof. dr. hab. Marcinem Światłą z Katedry Biochemii, Farmakologii i Toksykologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. We współpracy z Zakładami Farmaceutycznymi Polpharma S.A. w Starogardzie Gdańskim, uczestniczyłam w badaniach nad biodostępnością i biorównoważnością baklofenu i L-asparginianu L-ornityny. Brałam udział w opracowaniu metod elektroforetycznych i chromatograficznych oznaczania wyżej wymienionych substancji czynnych w materiale biologicznym (osocze, surowica, tkanki jadalne zwierząt) a następnie ich rzeczywistych aplikacji dotyczących określenia pozostałości czy profili farmakokinetycznych, zarówno u ludzi jak i u zwierząt hodowlanych. Wyniki tych badań zostały opublikowane w artykule pełnotestowym [zał. 4 pkt. II-A poz. 29] oraz w komunikatach naukowych przedstawionych w latach 1997-2002 na sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym [zał. 4 pkt. II-L poz. 8 oraz pkt. III-B poz. 55-71]. Ponadto w ramach współpracy z prof. dr. hab. Hanną Hopką oraz dr. Agnieszką Witek (Uniwersytet Medyczny w Lublinie) opracowałam elektroforetyczne warunki separacji bisoprololu, celiprololu oraz talinololu w preparatach farmaceutycznych [zał. 4 pkt. III-B poz. 64].

W tym czasie podjęłam badania związane z tematem mojej rozprawy doktorskiej nt. „Zastosowania elektroforezy kapilarnej w analizie leków stosowanych w weterynarii”.

Promotorem pracy doktorskiej był prof. dr hab. Henryk Lamparczyk, a jej publiczna obrona odbyła się 11 marca 2003 roku. Realizacja powyższych badań była możliwa dzięki finansowaniu w latach 2000-2002 ze źródeł wewnętrznych Akademii Medycznej w Gdańsku (obecnie Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego) w ramach kierowanego przeze mnie projektu badawczego własnego nt. „Opracowanie metod oznaczania wybranych antybiotyków stosowanych w weterynarii w materiale biologicznym metodą elektroforezy kapilarnej”. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane zarówno przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych w komunikatach zjazdowych [zał. 4 pkt. III-B poz. 55, 57, 59-63, 65-67] oraz w artykule pełnotestowym [zał. 4 pkt. II-A poz. 29], jak i po uzyskaniu tytułu doktora nauk farmaceutycznych w komunikatach naukowych [zał. 4 pkt. III-B poz. 42, 43, 47-51, 53-54] i artykułach pełnotekstowych [zał. 4 pkt. II-A poz. 25, 27, 28 i pkt. II-B poz. 36-41].

## **5.2. Aktywność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych**

Po obronie pracy doktorskiej tematyka moich badań w głównej mierze dotyczyła zastosowania elektroforezy kapilarnej w analizie substancji leczniczych i endogennych w próbkach biologicznych (surowica, osocze, mocz, tkanki) oraz leków i ich zanieczyszczeń w próbkach farmaceutycznych. Kontynuowałam badania nad izolacją leków z grupy linkozamidów, sulfonamidów, amfenikoli, cefalosporyn i chinolonów oraz azotanów i azotynów z żywności i tkanek jadalnych oraz nad opracowywaniem elektroforetycznych metod ich separacji [zał. 4 pkt. II-A poz. 10, 14, 17, 23, 24, 26; pkt. II-B poz. 35; pkt. II-L poz. 4 oraz pkt. III-B poz. 4, 21, 29, 33, 41, 44 i 52].

Kolejnym istotnym obszarem moich zainteresowań były zagadnienia związane z zastosowaniem technik elektroforetycznych oraz chromatograficznych do określania profili hormonów sterydowych w płynach ustrojowych w aspekcie ich zastosowania jako biomarkerów ekspozycji na stres, zaburzeń zdrowotnych związanych z wydzielaniem hormonów, czy jako wskaźników stosowania dopingu u sportowców. Poza publikacjami naukowymi, które zostały włączone do osiągnięcia naukowego [H1-H4], wyniki tych badań zostały opisane w czterech publikacjach pełnotekstowych [zał. 4 pkt II-A poz. 16, 18, 19, 22] oraz były prezentowane na sympozjach naukowych [zał. 4 pkt. II-L poz. 1, 3 oraz pkt. III-B poz. 2, 8, 11, 24, 27, 28, 30, 32, 34-36, 38, 39 i 46].

Ważnym, równoległym rozwijanym kierunkiem mojej aktywności naukowej był udział w badaniach poświęconych optymalizacji procesów ekstrakcji różnorodnych analitów z podłoża biologicznego bądź farmaceutycznego. Mając na uwadze duże znaczenie właściwego przygotowania próby, zwłaszcza biologicznej, do analizy separacyjnej optymalizowałam różnorodne techniki ekstrakcyjne. W tym celu stosowałam różne modyfikacje technik ekstrakcji ciecz-ciecz (ang. *Liquid-liquid Extraction, LLE*), ekstrakcji do fazy stałej (ang. *Solid Phase Extraction, SPE*) oraz mikroekstrakcji dyspersyjnej (ang. *Dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME*) [zał. 4 pkt. III-B poz. 2,7,30,46,52].

Kierunkiem poszerzającym moje umiejętności i wiedzę na temat technik elektromigracyjnych był udział w badaniach proteomicznych z zastosowaniem takich odmian elektroforezy kapilarnej jak: kapilarna elektroforeza żelowa (ang. *Capillary gel electrophoresis, CGE*), kapilarne ogniskowanie izoelektryczne (ang. *Capillary isoelectric focusing, CIEF*) oraz techniki elektroforezy planarnej jedno i dwukierunkowej (ang. *One- and Two Dimensional Gel Electrophoresis, 1D-PAGE, 2D-PAGE*). Badania te poświęcone były w głównej mierze poszukiwaniu biomarkerów chorób nowotworowych i były realizowane we współpracy z Kliniką Endokrynologii i Chorób Wewnętrznych GUMed, z Kliniką Pediatrii, Hematologii, i Onkologii GUMed, Pomorskim Parkiem Naukowo-Technologicznym w Gdyni, z Zakładem Biologii Komórki z Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed oraz z Centralnym Bankiem Tkanek i Materiału Genetycznego GUMed. Wyniki tych badań zostały opublikowane w artykułach pełnotekstowych [zał. 4 pkt. II-A poz. 9, 13; pkt. II-B poz. 32, 33] a także były zaprezentowane w formie doniesień zjazdowych na sympozjach i konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowych [zał. 4 pkt. II-L poz. 6 oraz pkt. III-B poz. 14, 17, 20, 26 i 31].

Uczestnictwo w badaniach porównawczych oceniających efektywność technik CE i HPLC w analizie leków pozwoliło mi na dalsze wszechstronne poznawanie i doskonalenie warsztatu badawczego, a wyniki tych badań zostały przedstawione w postaci doniesień naukowych na konferencjach [zał. 4 pkt. III-B poz. 37, 46]. Ponadto, w zakresie technik chromatograficznych, poza wspomnianymi wcześniej pracami z zakresu analiz hormonów sterydowych, brałam udział w badaniach z zastosowaniem metody HPLC z detekcją fluorescencyjną do oznaczania loratadyny w surowicy krwi oraz feksofenadyny w osoczu. Wyniki tych prac zostały opublikowane w dwóch artykułach pełnotekstowych oraz w postaci doniesień na sympozjach naukowych [zał. 4 pkt. II-A

**poz. 20, 21; pkt. III-B poz. 40**]. Uczestniczyłam także w projekcie, którego tematem była ocena przydatności faz stacjonarnych stosowanych w chromatografii w odwróconym układzie faz (RPLC) za pomocą systemów ich klasyfikacji opartych na metodzie KUL i modelach QSRR. Wyniki tych badań zaowocowały współautorstwem w publikacji pełnotekstowej [**zał. 4 pkt. II-A poz. 15**] oraz doniesieniem naukowym na sympozjum międzynarodowym [**zał. 4 pkt. III-B poz. 9**].

Ważnym obszarem moich zainteresowań naukowych było także oznaczanie witamin rozpuszczalnych w wodzie oraz rozpuszczalnych w tłuszczach technikami elektroforetycznymi. Prowadzone w tym zakresie projekty były realizowane we współpracy z prof. dr hab. Barbarą Pastuszewską (Instytut Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego w Jabłonce, Polska Akademia Nauk), dr Jolantą Paradziej-Łukowicz (Trójmiejska Akademicka Zwierzętnia Doświadczalna - Centrum Badawczo-Usługowe, GUMed) oraz z prof. dr hab. Barbarą Kamińską (Klinika Pediatrii, Gastroenterologii, Hepatologii i Żywienia Dzieci, GUMed). Wyniki badań, poza pracami włączonymi do prezentowanego osiągnięcia naukowego [**H5-H7**] zostały opublikowane w artykule pełnotekstowym [**zał. 4 pkt. II-A poz. 12**] oraz zaprezentowane w postaci doniesień na konferencjach krajowych i międzynarodowych [**zał. 4, pkt. II-L poz. 5, 7 oraz pkt. III-B poz. 1, 7, 10, 13, 15, 16, 18, 19, 25 i 45**].

W chwili obecnej moje zainteresowania naukowe dotyczą technik wzmacniania sygnału w kapilarze, co pozwala pokonać jedną z podstawowych niedogodności elektroforezy kapilarnej, jaką jest jej niedostateczna czułość. W tym zakresie, w ramach współpracy z prof. dr hab. Elżbietą Skrzydlewską z Zakładu Chemii Nieorganicznej i Analitycznej, Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, uczestniczyłam w badaniach nad zastosowaniem techniki RI-FASS (*ang. repetitive injection field-amplified sample stacking*) w analizie sześciu substancji leczniczych stosowanych w psychiatrii [**zał. 4 pkt. II-A poz. 11**] oraz kierowałam badaniami nad wzmocnieniem sygnału pochodnych benzodiazepiny w moczu ludzkim. Te ostatnie badania realizowane były we współpracy z prof. dr hab. Adamem Prahlem z Instytutu Syntez Organicznych Wydziału Chemii Uniwersytetu Gdańskiego i stanowią część przedstawionego osiągnięcia naukowego [**H8**]. Ponadto, wyniki badań dotyczące tej tematyki zostały opublikowane w czasopiśmie spoza listy filadelfijskiej [**zał. 4 pkt. II-B poz. 30**] oraz zostały przedstawione w postaci komunikatu ustnego i dwóch doniesień na konferencjach o zasięgu międzynarodowym [**zał. 4 pkt. II-L poz. 2; pkt. III-B poz. 5 i 12**].

Równoległe z badaniami dotyczącymi technik wzmocnienia sygnału *on-line* w kapilarze, uczestniczę w badaniach nad oznaczaniem amin biogennych w realnych próbach moczu i surowicy krwi pacjentów pediatrycznych ze zdiagnozowanym nowotworem typu neuroblastoma, a także u pacjentów neurologicznych po udarze mózgu. Powyższe analizy są wykonywane z zastosowaniem metod elektroforetycznych, a ich wyniki zostały już częściowo przedstawione w formie komunikatu [zał. 4 pkt. III-B poz. 6]. W toku są również pionierskie badania nad wykorzystaniem śliny pacjentów jako materiału diagnostycznego do tego rodzaju oznaczeń.

Ponadto jako uczestnik 24<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis w Bolonii w 2013 roku napisałam artykuł będący podsumowaniem przebiegu obrad [zał. 4 pkt. II-B poz. 31].

Byłam także recenzentem 7 publikacji naukowych w czasopismach: *Analytical Methods*, *International Research Journal of Pure and Applied Chemistry*, *Talanta*, *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, *Analytical Letters*, *Journal of AOAC International*, *Current Pharmaceutical Analysis*.

## 6. Udział w projektach badawczych

W trakcie swojej działalności na polu naukowo-badawczym realizowałam cztery projekty badań własnych finansowane z wewnętrznych źródeł Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego dotyczące zastosowania elektroforezy kapilarnej do oznaczania substancji leczniczych stosowanych w weterynarii, jak również do badań biomonitoringowych w analizie białek i ocenie jakości zdrowotnej żywności. Ponadto, jeden z projektów dotyczył opracowania nowych kolumn monolitycznych do oznaczeń peptydów i białek techniką HPLC.

Uczestniczyłam również w realizacji projektu finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego N N405 423839 związanego z usprawnieniem rozdzielności peptydów w proteomice z wykorzystaniem HPLC z gradientem pH (jako główny wykonawca). Obecnie współpracuję jako główny wykonawca w projekcie finansowanym przez Narodowe Centrum Nauki 2011/03/B/NZ7/02333 nad biomedyczną i chemometryczną oceną nowych narzędzi analitycznych w badaniach substancji endogennych jako potencjalnych biomarkerów nowotworowych. Efektem realizacji tego projektu badawczego, jest publikacja włączona do osiągnięcia naukowego [H3]. Pełnię również funkcję wykonawcy międzynarodowego projektu realizowanego w latach 2015-

2017, który dotyczy polsko-indyjskiej współpracy w zakresie opracowania nowych formułacji i technologii analitycznych dla leków pochodnych benzodiazepiny stosowanych w pediatrii i geriatrici.

W latach 2010-2015 przygotowałam i wysłałam do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego oraz do Narodowego Centrum Nauki po trzy wnioski jako kierownik projektu. Powyższe projekty mimo wysokich ocen nie zostały zakwalifikowane do finansowania uzyskując jednocześnie noty: 4 krotnie – projekt dobry, 1 krotnie – projekt bardzo dobry, 1 krotnie – projekt wyróżniający się.

## **7. Działalność dydaktyczna i organizacyjna**

Moim osiągnięciem dydaktycznym jest współautorstwo skryptu dla studentów III roku kierunku farmacja, którego tematem są chemiczne metody identyfikacji środków leczniczych. Ponadto, prowadzę zajęcia dydaktyczne dla studentów III roku kierunku farmacja w ramach ćwiczeń z Chemii Leków oraz zajęcia fakultatywne dla studentów II-V roku kierunku farmacja. Biorę aktywny udział w prowadzeniu kursów szkoleniowych w ramach kształcenia ustawicznego dla farmaceutów, a także w prowadzeniu zajęć wchodzących w zakres studiów podyplomowych. Byłam opiekunem 12 prac magisterskich wykonywanych przez studentów Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (dawnej Akademii Medycznej w Gdańsku).

Od roku 2010 jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego oraz od roku 2013 pełnię funkcję członka Komisji Rekrutacyjnej ds. Odwołań. Jako członek Komitetu Organizacyjnego brałam aktywny udział w przygotowaniu Międzynarodowego Sympozjum „7<sup>th</sup> Polish-German Symposium on Pharmaceutical Sciences”, które odbyło się na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w dniach 24-25 maja 2013 roku.

## **8. Nagrody i wyróżnienia**

Za prowadzone badania naukowe i osiągnięcia otrzymałam osiem Nagród Naukowych Zespołowych Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w tym 3 Nagrody II-stopnia w latach 1998, 2005 i 2007 oraz 5 Nagród I-stopnia w latach 2009, 2011, 2012 (2 nagrody) i 2014 [zał. 4 pkt. II-K].

## 9. Podsumowanie dorobku naukowego

Charakter pracy	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora
Łączna liczba wszystkich prac oryginalnych i przeglądowych		41
Liczba opublikowanych prac oryginalnych	2	39
w tym publikacji z tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	2	27
w tym publikacji spoza tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	-	12
Liczba opublikowanych prac przeglądowych	-	1
w tym publikacji z tzw. <i>listy filadelfijskiej</i>	-	1
Łączna liczba doniesień naukowych, w tym:	18	61
posterów	17	54
komunikatów ustnych	1	7
Sumaryczny $IF^1$ prac (Punktacja <i>MNiSW</i> )	3,166 (9)	52,723 (682)
Sumaryczny $IF^1$ wszystkich prac (Punktacja <i>MNiSW</i> )		55,889 (691)
Sumaryczna liczba cytowań wszystkich prac według bazy <i>Web of Science</i> <sup>2</sup> ; według bazy <i>Scopus</i> <sup>3</sup>	164 (bez autocytowań 148) <sup>2</sup>	181 (bez autocytowań 172) <sup>3</sup>
Indeks Hirscha <sup>4,5</sup>		7 <sup>4</sup> /8 <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Wartości IF zgodnie z rokiem opublikowania oprócz prac z roku 2015 (brak wskaźnika)

<sup>2</sup> Liczba cytowań publikacji według bazy *Web of Science* z dnia 25.06.2015 r.

<sup>3</sup> Liczba cytowań publikacji według bazy *Scopus* z dnia 25.06.2015 r.

<sup>4</sup> Indeks Hirscha według bazy *Web of Science* z dnia 25.06.2015 r.

<sup>5</sup> Indeks Hirscha według bazy *Scopus* z dnia 25.06.2015 r.

Podsumowując, mój dorobek naukowy przed uzyskaniem stopnia naukowego doktora obejmował 2 publikacje oraz 18 doniesień naukowych przedstawionych na konferencjach o łącznym wskaźniku oddziaływania  $IF = 3,166$  oraz punktacji *MNiSW* = 9. Po uzyskaniu stopnia doktora mój dorobek naukowy zwiększył się i na dzień 25.06.2015 roku obejmuje sumarycznie 29 publikacji oryginalnych z listy filadelfijskiej oraz 12 publikacji opublikowanych w czasopiśmie spoza listy filadelfijskiej, a także 79 doniesień konferencyjnych o sumarycznym współczynniku  $IF = 55,889$  i 691 punktów *MNiSW*. Liczba cytowań moich publikacji na dzień 25.06.2015 roku wynosi według bazy *Web of Science* 164 (wg *Scopus* 181), podczas gdy indeks Hirscha według bazy *Web of Science* wynosi 7 (wg *Scopus* 8).

Ilona Ołędzka