STRESZCZENIE

Zmiana podejścia w zakresie zapewnienia jakości dotyczącego analityki i bioanalityki farmaceutycznej (koncepcja *analytical Quality by Design*, aQbD) oraz złożoność i wielowymiarowość danych pomiarowych wymusza poszukiwanie skutecznych i wydajnych narzędzi usprawniających opracowywanie, optymalizację, walidację metod oraz procesów analitycznych.

Tematyka podjęta w niniejszej pracy doktorskiej obejmuje aspekty związane z opracowaniem wysokiej jakości metod analitycznych do oznaczenia wybranych substancji farmaceutycznych w próbkach o zróżnicowanej matrycy biologicznej. Ponadto w pracy doktorskiej przedstawiono aspekty związane z oceną przydatności metodyki DoE i możliwościami zastosowania wybranych planów doświadczeń w realizacji pięciu projektów badawczych z zakresu analizy biofarmaceutycznej, czyli w:

- opracowaniu, optymalizacji i walidacji metody oznaczania ilościowego lewofloksacyny w prostacie i osoczu za pomocą techniki UHPLC-DAD oraz w opracowaniu i optymalizacji metody przygotowania próbek prostaty do oznaczeń,
- walidacji metody oznaczania ilościowego lewofloksacyny i cyprofloksacyny w tkance prostaty z użyciem techniki HPLC-ESI-MS/MS oraz walidacji metody przygotowania tkanki do oznaczeń,
- optymalizacji parametrów źródła jonów ESI w metodzie oznaczania ilościowego deksmedetomidyny w osoczu z użyciem HPLC-ESI-MS/MS i walidacji metody analitycznej;
- optymalizacji parametrów źródła jonów ESI w trybie jonów dodatnich i ujemnych, w analizie metabolicznej 18 związków w moczu techniką HPLC-ESI-MS/MS,
- walidacji metody oznaczania ilościowego cyklosporyny A w tkankach i płynach oka królików techniką UHPLC-DAD i wyznaczeniu limitów kontrolnych metody badania elastyczności.

W pierwszym projekcie oznaczania ilościowego lewofloksacyny w tkance prostaty i w osoczu za pomocą UHPLC-DAD, zaproponowano zastosowanie planu Box-Behnken'a do optymalizacji parametrów chromatograficznych, ułamkowego planu czynnikowego do badań przesiewowych parametrów potencjalnie wpływających na wydajność procesu ekstrakcji analitu z tkanki i planu centralnego kompozycyjnego do optymalizacji wybranych czynników. Plan Plackett-Burman'a wykorzystano do badania elastyczności metody. Odkryte zależności,

które opisano równaniami regresji liniowej i trójwymiarowe wykresy powierzchni odpowiedzi umożliwiły wybór najistotniejszych parametrów i ich najkorzystniejszych ustawień oraz ocenę elastyczności metody chromatograficznej.

W kolejnym etapie badań, polegającym na oznaczaniu lewofloksacyny i cyporofloksacyny w tkance prostaty z użyciem techniki HPLC-ESI-MS/MS, wykorzystano ułamkowy plan czynnikowy i plan Plackett-Burman'a jako narzędzia wspomagające walidację metody analitycznej i walidację metody przygotowania tkanki do oznaczeń. Analiza modeli oparta na statystyce Fishera i teście t-Studenta pozwoliła na efektywną ocenę elastyczności obu metod.

W następnym projekcie oznaczania ilościowego deksmedetomidyny w osoczu pacjentów pediatrycznych za pomocą HPLC-ESI-MS/MS skorzystano z centralnego planu kompozycyjnego do wyznaczenia najistotniejszych parametrów źródła jonów ESI oraz interakcji między parametrami, wpływającymi na czułość metody. Wykresy konturowe umożliwiły zobrazowanie charakteru i wielkości wpływu czynników, a wykresy predykcyjne dobór najbardziej optymalnych ustawień parametrów źródła. Plan Plackett-Burman'a wykorzystany do oceny elastyczności metody analitycznej, umożliwił dokładną analizę głównych wpływów, bez zbędnej w tym wypadku oceny interakcji.

W kolejnym etapie badań zastosowano kilkuetapową strategię optymalizacyjną parametrów źródła jonów ESI w analizie metabolicznej związków obecnych w moczu z użyciem techniki HPLC-ESI-MS/MS i z wykorzystaniem planu przesiewowego ułamkowego, a następnie planu RSM typu Box-Behnken'a oraz planu centralnego kompozycyjnego. Skonstruowane modele regresyjne w zadowalający sposób przewidywały wartości odpowiedzi. Usystematyzowana i przejrzysta analiza zależności przyczynowo-skutkowych wpisuje się w założenia nowej koncepcji w bioanalityce farmaceutycznej, aQbD.

W projekcie oznaczania cyklosporyny A w tkankach i płynach oka królików za pomocą UHPLC-DAD zastosowany plan ułamkowy umożliwił ocenę elastyczności metody chromatograficznej dla dwóch odpowiedzi, stężenia analitu i współczynnika retencji. W przypadku drugiej odpowiedzi, metoda nie spełniła założonych kryteriów akceptacji, toteż korzystając m.in. z wykresów predykcyjnych i konturowych wyznaczono nowe limity kontrolne, w których metoda zachowuje się w sposób elastyczny.

Uzyskane wyniki świadczą o zasadności wykorzystania planów doświadczeń i o szczególnych korzyściach płynących ze stosowania podejścia DoE. Wykorzystana metodyka stanowi przykład realizacji nowoczesnych trendów w bioanalityce farmaceutycznej.

ABSTRACT

The new *analytical Quality by Design* (aQbD*)* approach, which now seems to be a pending issue in pharmaceutical and biopharmaceutical field, together with the complexity and multidimensional structure of collected data, are the reasons of searching efficient tools supporting development, optimization and validation of bioanalytical methods and processes.

The topics discussed in present doctoral thesis cover aspects related to the development of high-quality methods for determination of pharmaceutical substances in various biological materials as well as aspects related to suitability assessment of DoE methodology and possibilities of applying selected experimental plans during the implementation of five research projects in terms of bioanalytical studies, i.e.:

- development, optimization, and method validation for quantitative determination of levofloxacin in plasma and prostate's tissue with the use of UHPLC-DAD; development and optimization of sample preparation procedure,
- method validation for quantitative determination of levofloxacin and ciprofloxacin in prostate's tissue with the use of HPLC-ESI-MS/MS; validation of sample preparation procedure,
- optimization of ESI source parameters in HPLC-ESI-MS/MS method for quantitative determination of dexmedetomidine in plasma; validation of analytical method,
- optimization of ESI source parameters in HPLC-ESI-MS/MS method for quantitative determination of 18 metabolites in urine,
- method validation for quantitative determination of cyclosporine A in rabbit eye tissue and fluids with the use of UHPLC-DAD.

In the first project related to levofloxacin's quantitative determination in human prostate tissue and plasma with the use of UHPLC-DAD, Box-Behnken design was proposed for the optimization of chromatographic parameters, fractional factorial design for screening of parameters which potentially influence yield of the analyte extraction from tissue and central composite design for optimization of selected parameters. Plackett-Burman design was applied for method's robustness evaluation. The revealed relationships described by regression equations and three-dimensional response surface plots provided a selection of the crucial parameters, their most favorable settings and robustness evaluation of the chromatographic method.

In the second study concerning levofloxacin's and ciprofloxacin's quantitative determination in human prostate tissue using HPLC-MS/MS, fractional factorial and Plackett-

Burman designs were applied as tools supporting validation of analytical method and sample preparation procedure. Evaluation of obtained models based on F-statistics and t-Student test allowed for effective robustness assessment of both tested methods.

In the next stage of the doctoral thesis, dexmedetomidine determination in human plasma with the use of HPLC-MS/MS, central composite design was applied for selection of crucial electrospray (ESI) source parameters and interactions that have an influence on method sensitivity. Contour plots graphically showed character and magnitude of parameter effects, whereas prediction plots enabled selection of the most optimal ion source settings. Plackett-Burman design which was applied during robustness study, enabled deep and detailed estimation of main effects, without unnecessary interaction analysis.

In the third project concerning the metabolic analysis of 18 metabolites in human urine with the use of HPLC-MS/MS technique, stepwise optimization strategy was proposed for ESI ion source settings establishment. Firstly, screening design, fractional factorial design, was applied and then RSM designs like Box-Behnken and central composite design were chosen. Constructed regression models predicted response values satisfactorily. Systematic and transparent analysis of cause-effect relationships is in accordance with the new aQbD concept.

In the last study regarding cyclosporine A determination in rabbit eye tissue and fluids using UHPLC-DAD, fractional factorial design was applied in order to assess the robustness of chromatographic method for two responses, namely concentration of the analyte and retention factor. Concerning the second response, the developed method did not meet acceptance criteria, so prediction and contour plots were applied for new control limits definition.

The obtained results demonstrate the suitability of experimental design approach and indicate unique benefits of DoE application. Applied DoE methodology serves as an example of implementation of new trends in bioanalysis research.