



AUTOREFERAT

dr n. farm. Anna Klimek-Turek

Katedra Chemii,
Zakład Chemii Fizycznej
Wydział Farmaceutyczny
Uniwersytet Medyczny w Lublinie

Lublin 2020

Spis treści

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.	4
5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.	35
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.	36
7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.	37

1. Imię i nazwisko.

Anna Klimek-Turek

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- Dyplom magistra farmacji – 2005 r. *Akademia Medyczna w Lublinie*, na podstawie pracy magisterskiej pt. „*Wpływ modyfikatora na selektywność rozdzielania wybranych fenolokwasów w układach jonowo-asocjacyjnych RPHPLC*” wykonanej w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii pod kierunkiem dr hab. Tadeusza Dzido.
- Dyplom doktora nauk farmaceutycznych – 2010 r. *Uniwersytet Medyczny w Lublinie* na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „*Wpływ modyfikatora eluentu na selektywność rozdzielania substancji z uwzględnieniem związków biologicznie aktywnych i odwróconych układów jonowo-asocjacyjnych wysokosprawnej chromatografii cieczowej*” wykonanej w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii pod kierunkiem dr hab. Tadeusza Dzido.

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- od 2012 do chwili obecnej - Katedra Chemii, Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie na etacie adiunkta
- 2010 - 2012 r. – Katedra Chemii, Zakład Chemii Fizycznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie na etacie asystenta

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy.

Wprowadzenie

Oznaczanie substancji biologicznie aktywnych w matrycach biologicznych jest ważnym aspektem analizy. Otrzymane wyniki są wykorzystywane do podejmowania kluczowych decyzji, gwarantujących bezpieczeństwo i skuteczność działania substancji czynnej [1-3]. Niestety, większość próbek badanych w laboratorium analitycznym nie nadaje się do bezpośredniej analizy technikami instrumentalnymi ze względu na dużą ich złożoność. Ponadto anality w próbkach często charakteryzują się bardzo małymi stężeniami, podczas gdy substancje interferujące są liczne i występują w dużych ilościach [4-6]. Uzyskanie wiarygodnego wyniku analizy chemicznej wymaga od analityka poświęcenia uwagi wszystkim etapom składającym się na proces analityczny, ale bezsprzecznie etap przygotowania próbek należy do najważniejszych, a zarazem najtrudniejszych i najbardziej czasochłonnych [1-6]. Etap ten zajmuje około 60 - 80% całkowitego czasu analizy [7-8], jednocześnie jest jednym z głównych źródeł błędów wpływających na końcowe wyniki oznaczenia [9]. Szacuje się, że aż 30 - 40% błędnych wyników spowodowana jest nieprawidłowym przygotowaniem próbki [10], a pozostałe 60 - 70% całkowitego błędu analizy przypada na pomiar wraz z walidacją metody i obróbkę danych [2,7,11].

Skrócenie czasu przygotowania próbki, uproszczenie metodyki, zwiększenie selektywności wydzielania substancji będących przedmiotem zainteresowania, poprawa własności analitycznych oznaczeń (dokładność, precyzja, granice wykrywalności i oznaczalności) oraz jak najmniejszy koszt analizy, to główne cechy, do których należy dążyć, opracowując procedurę przygotowania próbki [12-13]. Nie można również zapomnieć o aspekcie „ekologicznym”, głównie w zakresie zmniejszenia zużycia rozpuszczalników [14-15]. Dodatkowym atutem procedury jest możliwość jej automatyzacji oraz bezpośrednie połączenie (on-line) z urządzeniem do analizy instrumentalnej [10,16-17]. Automatyzacja procedury pozwala osiągnąć lepszą precyzję, dokładność oraz powtarzalność wyników, a także wyższą przepustowość. Mimo że taka procedura nie zawsze jest krótsza od przeprowadzanej w sposób manualny, to w trakcie pomiaru umożliwia analitykowi wykonywanie innych czynności laboratoryjnych oraz chroni go przed długotrwałym kontaktem ze szkodliwymi próbkami/odczynnikami [18,19].

Cel badań osiągnięcia habilitacyjnego

Głównym celem moich badań naukowych, przedstawionych w pracach zgłoszonych do niniejszego postępowania habilitacyjnego [H1-H6], były aspekty związane z weryfikacją założeń teoretycznych i opracowaniem reguł praktycznych innowacyjnej techniki przygotowania próbek biologicznych, w której wykorzystywana jest ekstrakcja ciecz - ciało stałe z pozycji frontu rozpuszczalnika na/w warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej (ang. Solvent Front Position Extraction, SFPE), do oznaczania substancji technikami instrumentalnymi.

Przeprowadzone badania można podzielić na cztery etapy:

1. Przyjęcie założeń teoretycznych i ich weryfikacja [H1]
2. Badania nad możliwością zastosowania procedury SFPE do przygotowania testowych próbek biologicznych w celu ilościowego oznaczania zawartych w nich substancji [H1 - H3].
3. Optymalizacja warunków prowadzenia procedury SFPE [H1 – H6].
4. Próby częściowej automatyzacji procedury SFPE [H4 - H5].
5. Zastosowanie procedury SFPE, jako techniki przygotowania próbki, do oznaczania substancji biologicznie czynnej (tryptofanu) w próbkach klinicznych [H6].

Techniki przygotowania próbek

Materiałem biologicznym najczęściej pobieranym od pacjentów w celu wykonania badań laboratoryjnych, jest krew żylna lub włośniczkowa, jednakże krew pełną poddaje się analizie w ograniczonym zakresie [20-22]. Jest ona materiałem z wyboru w przypadku badań hematologicznych (morfologia krwi obwodowej, Odczyn Biernackiego), niektórych badań cytogenetycznych, czy podczas oznaczania parametrów gospodarki kwasowo – zasadowej [23]. Do badań biochemicznych, hormonalnych, oznaczeń markerów nowotworowych i innych analiz stosuje się zwykle osocze lub surowicę krwi [23].

Ze względu na złożony charakter materiału biologicznego, konieczne jest oddzielenie oznaczanych związków od substancji, które mogłyby zakłócać wynik oznaczeń. Wśród najważniejszych związków interferujących można wymienić sole i fosfolipidy odpowiedzialne za efekty matrycowe w analizie metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią

mas (LC – MS) [24 - 29]. Dodatkowo fosfolipidy są bardzo szkodliwe dla oprzyrządowania analitycznego, ponieważ mogą nieodwracalnie adsorbować się na fazie stacjonarnej, powodując znaczną utratę aktywności i sprawności kolumny, wzrost ciśnienia wstecznego lub nawet zablokowanie kolumny [24,30-32].

Tradycyjne metody przygotowywania próbek biologicznych obejmują dobrze znane i zoptymalizowane techniki, szeroko rozpowszechnione w laboratoriach analitycznych. Proste, niezawodne i wysokoprzepustowe techniki przygotowywania próbek są gwarancją osiągnięcia w rozsądnym czasie dokładnych wyników i spełnienia rygorystycznych wymagań dotyczących walidacji metod w bioanalizie [1-2,7-8,33]. Do najczęściej stosowanych można zaliczyć strącanie białka (PP, protein precipitation), ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE, liquid-liquid extraction) oraz ekstrakcję do fazy stałej (SPE, solid phase extraction) [24,34-35].

Strącanie białka, a następnie wirowanie (lub inny etap oddzielania osadu) należy do najstarszych, ale nadal chętnie stosowanych technik przygotowywania próbek w bioanalizie [24,34-37]. Popularność tej techniki wynika z bardzo szybkiego przetwarzania próbek, łatwej optymalizacji metody, prostoty wykonania i braku wymogu posiadania specjalnego sprzętu. Niestety zalety te okupione są wieloma wadami. Ze względu na co najmniej trzykrotne rozcieńczenie próbki, technika ta może być zastosowana tylko do próbek, w których stężenie substancji oznaczanej jest relatywnie wysokie [24,34-36]. Wprawdzie w celu zateżenia próbki, można ją poddać procesowi odparowania rozpuszczalnika, ale jest to dodatkowa czasochłonna procedura, która w przypadku próbek zawierających lotne lub/ oraz nieodporne na wysokie temperatury substancje może prowadzić do ich utraty i poważnych błędów analizy [24]. Z uwagi na wieloetapowość, automatyzacja procedury nie należy do najłatwiejszych, aczkolwiek aby uczynić ją mniej pracochłonną, etap dodawania odczynnika strącającego, mieszania oraz filtrowania często wykonuje się w jednym urządzeniu [38-39]. W przypadku małej liczby próbek procedura może być przeprowadzana w odrębnych probówkach. Podejście takie jest bardzo czasochłonne, więc współcześnie odchodzi się od niego na rzecz mikro płytek, kompatybilnych z autosamplerami stosowanymi w HPLC. Stosuje się 96 dołkowe płytki, wyposażone są w filtry membranowe, w których, po etapie strącania białek, przeprowadzane jest filtrowanie próbki z pominięciem etapu wirowania [40,41]. Takie podejście pozwala na częściowe zautomatyzowanie procedury oraz zmniejszenie koniecznej objętości próbki. Ponadto prowadzi do zwiększenia powtarzalności wyników i skrócenia czasu przygotowania próbki [41-45]. Niestety niska selektywność i skuteczność oczyszczania próbek prowadzi do znacznego obniżenia czułość metody poprzez tzw. efekty matrycowe [26-29].

Równie prostą, jak strącanie białek, techniką przygotowania próbek, niewymagającą posiadania specjalnego sprzętu czy umiejętności, jest ekstrakcja ciecz-ciecz [24, 34-35, 46-47], która opiera się na przeniesieniu analitu z próbki wodnej do rozpuszczalnika niemieszającego się z wodą. W porównaniu do PP technika ta posiada większy potencjał do usunięcia części związków interferujących [24, 34-35]. Niestety nie jest pozbawiona licznych wad takich, jak możliwość tworzenia się pęcherzyków i emulsji podczas wykonywania procesu, czy brak możliwości zastosowania do ekstrakcji związków hydrofilowych. Co może być istotnym problemem w bioanalizie, ponieważ niektóre leki i wiele metabolitów posiadają właściwości polarne. Dodatkowo wysokie zużycie toksycznych rozpuszczalników organicznych, a tym samym wytwarzanie dużej ilości odpadów organicznych, sprawia, że LLE jest techniką drogą i szkodliwą dla środowiska [24,34-35]. Ponadto, ze względu na dużą liczbę operacji manualnych, jest bardzo trudna do przeprowadzenia w wersjach online oraz zautomatyzowanej [24,34-35]. Podobnie jak w przypadku PP [40-41] współcześnie w technice LLE odchodzi się od przeprowadzania ekstrakcji w pojedynczych próbkach, na rzecz zbiorczych mikro płytek, a część operacji manualnych wykonywana jest automatycznie (np. pipetowanie) [48-51].

Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się techniki mikroekstrakcji w układzie ciecz-ciecz [52-54]. Charakteryzują się one małym zużyciem rozpuszczalników, co jest korzystne dla zdrowia ludzkiego oraz środowiska naturalnego. Stosowanie niewielkich ilości rozpuszczalników ogranicza też zdecydowanie liczbę operacji wykonywanych podczas ekstrakcji, niestety techniki te są nadal dość czasochłonne [55-57].

Jedną z najczęściej wybieranych technik przygotowania próbek do instrumentalnego oznaczania substancji jest ekstrakcja do fazy stałej, która nie tylko pozwala na oczyszczenie próbki, ale też wstępnie zateża substancje będące przedmiotem oznaczenia [24,34-36,58-59]. Ekstrakcja do fazy stałej polega na przeniesieniu analitów znajdujących się w próbce ciekłej do fazy stałej. Rozdzielenie związków zachodzi w oparciu o współczynnik ich podziału między rozpuszczalnik i stały sorbent. Protokół ekstrakcji SPE obejmuje kilka etapów, w tym aktywację i kondycjonowanie sorbentu, ładowanie próbki, etap płukania i elucję analitów [24,34-36,58-59]. Procedura odbywa się przy użyciu kolektora próżniowego SPE, dlatego wymagania, dotyczące wyposażenia, są nieco wyższe niż w LLE lub PP. Należy zauważyć, że ręcznie wykonywana ekstrakcja do fazy stałej jest dość czasochłonną, wieloetapową procedurą, szczególnie gdy potrzebne jest odparowanie rozpuszczalnika eluatu SPE i ponowne rozpuszczenie próbki w rozpuszczalniku odpowiednim do kolejnych eksperymentów, np. HPLC, czy MS. SPE jest również dość drogą techniką, ponieważ kolumny do ekstrakcji są

wytwarzane tylko do jednorazowego użytku i wymagają stosunkowo dużych ilości rozpuszczalników organicznych [59]. Niewątpliwie technika SPE posiada wiele zalet takich, jak możliwość izolacji i wzbogacania związków z próbek ciekłych i gazowych, zapobieganie procesom biodegradacji w czasie przechowywania próbek, zwłaszcza wodnych, wysoki odzysk, możliwość usuwania nierozpuszczalnych soli, łatwość obsługi i automatyzacja [24, 4-36,58-59]. Obecny rozwój techniki SPE koncentruje się na jej miniaturyzacji, automatyzacji (techniki przygotowywania próbek w wersji on-line”), zwiększonej selektywności i nowych materiałach [61-66].

Kolejną techniką, często wybieraną do przygotowania próbek do analizy instrumentalnej jest QuEChERS (ang. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) [67]. Procedura ta, składająca się z kilku etapów, jest połączeniem ekstrakcji ciecz-ciecz (liquid-liquid extraction, LLE) oraz dyspersyjnej ekstrakcji do fazy stałej (dSPE, dispersive solid phase extraction). Zaletą QuEChERS jest niewielkie zużycie próbki i toksycznych rozpuszczalników oraz wysoki odzysk analizowanych związków [68-72]. Metoda ta może być modyfikowana poprzez odpowiedni dobór układu ekstrakcyjnego, w zależności od rodzaju matrycy próbki oraz substancji będących przedmiotem zainteresowania [73-76].

Nieco mniej popularną techniką przygotowania próbek biologicznych, jednak bardzo istotną z punktu widzenia badań przesiewowych jest analiza suchej kropli krwi (DBS, dried blood spot) [77-81]. Polega ona na pobraniu niewielkiej ilości krwi włośniczkowej przy pomocy automatycznego nakłuwacza, a następnie przeniesieniu kropli na specjalny krążek bibuły (karta badania). Tak naniesioną kroplę krwi pozostawia się do wyschnięcia w temperaturze pokojowej, dzięki czemu próbka jest łatwiejsza do transportu i nie wymaga specjalnych warunków przechowywania [77-79,81]. Po ekstrakcji badanego związku można przystąpić do jego oznaczania, najczęściej techniką LC-MS [81]. Metoda ta ma wiele zalet: materiał może być pobrany samodzielnie przez pacjenta, w warunkach domowych, do przeprowadzenia analizy nie jest konieczne posiadanie dużych ilości krwi, jak ma to miejsce w przypadku klasycznego pobierania krwi pełnej, a sama próbka nie wymaga wcześniejszego przygotowania lub użycia substancji przeciwzkrzepowych, co zapewnia lepszą stabilność podczas transportu i przechowywania. Metoda ta, przy zachowaniu odpowiedniej higieny wykonania, umożliwia zmniejszenie ryzyka zakażenia wirusami HIV czy HCV [80-81]. Niestety, nie jest wolna od wad takich, jak możliwość zanieczyszczenia próbki przez pacjenta, konieczność użycia czułych technik analizy, a mała ilość pobranego materiału uniemożliwia powtórzenie lub wykonanie innych badań [77-80]. Ponadto w wyniku braku separacji

składników, będących przedmiotem zainteresowania, od matrycy próbki może dojść do zanieczyszczenia urządzeń pomiarowych, a w przypadku analiz z zastosowaniem detektora MS także do efektów matrycowych [82].

Ciekawą techniką przygotowania próbek, jest podejście zaprezentowane przez Oellig and Schwack'a pod nazwą „High-throughput planar solid phase extraction (HTpSPE)” [83-85]. Wprawdzie technika ta została opracowana do oznaczania pestycydów w produktach spożywczych, a nie w próbkach krwi czy surowicy, które były głównym tematem mojego zainteresowania, jednakże przedstawione przez zespół prof. Schwacka podejście, było pewną inspiracją do opracowania prezentowanej przeze mnie techniki przygotowania próbek. Stąd zasadne wydaje się opisanie go w tym miejscu. Podczas przygotowania próbek techniką HTpSPE roztwór próbki nanosi się za pomocą automatycznego aplikatora na warstwę adsorbentu płytki chromatograficznej, w postaci pasma lub okrągłej strefy, i prowadzi rozwijanie chromatogramu na dystansie 75 mm, używając acetonitrylu jako fazy ruchomej. Następnie, po osuszeniu płytki, dokonuje się rozwijania chromatogramu z przeciwnej strony płytki (w przeciwnym kierunku w stosunku do kierunku pierwszego rozwijania) roztworem acetonu na dystansie 46 mm. Następnie z miejsca wyznaczonego poprzez barwnik Sudan III (który jako marker zostaje dodany do ekstraktu przed naniesieniem na płytkę) ekstrahuje się oznaczane składniki, przy wykorzystaniu specjalnego urządzenia, np. TLC – MS Interface firmy Camag, i kieruje te składniki do urządzenia do analizy instrumentalnej (chromatografu cieczowego i/lub spektrometru mas) [83]. Autorzy podają, że czas trwania tak przeprowadzonej procedury przy zastosowaniu płytek 10 × 20 cm oraz automatycznym naniesieniu na płytkę 20 próbek wynosi 4,5 min/próbkę. Wartość procentowa względnego odchylenia standardowego RSD (relative standard deviation) wyników uzyskanych dla tak przygotowanych próbek wynosi 0,3 – 4,1% a odzysk 90 - 104% [83].

Metoda Oellig i Schwacka nie jest jednak pozbawiona szeregu wad. Po pierwsze, jest dedykowana tylko dla próbek, które mogą być naniesione aplikatorem automatycznym, co wyklucza analizę składników z próbek silnie zanieczyszczonych, lepkich, czy o dużej gęstości. Po drugie, podczas przeprowadzania procedury wymagane jest dokładne określenie odległości migracji rozpuszczalnika przy pierwszym rozwinięciu oraz odległości migracji substancji oznaczanych i standardu wewnętrznego podczas drugiego rozwijania chromatogramu (po obrocie płytki o 180°). W celu ustalenia położenia strefy substancji konieczne jest zastosowanie metody wizualizacji (dodanie markera). Głównym jednakże problemem jest fakt, że rozwijanie chromatogramu w dwóch kierunkach, przy zastosowaniu

rozpuszczalników o dużej sile elucji, prowadzi do sytuacji, że część zanieczyszczeń próbki, która wędruje w czole fazy ruchomej podczas pierwszego etapu rozwijania, po drugim rozwijaniu chromatogramu będzie obecna w strefie substancji będących przedmiotem zainteresowania, i wraz z nimi zostanie wyekstrahowana do roztworu końcowego. Powoduje to przenoszenie większej liczby składników próbki, nie tylko substancji oznaczanych, ale także i zanieczyszczeń pochodzących z jej matrycy, do urządzenia do analizy instrumentalnej, co komplikuje proces oznaczania ilościowego i jakościowego. Oellig i Schwack w swoim artykule podkreślają, że rozwijanie chromatogramu w jednym kierunku nie prowadzi do zadowalających wyników [83]. Natomiast podstawy teoretyczne pozwalały mi przypuszczać, że takie rozwiązanie jest możliwe i wymaga głębszych badań.

Ekstrakcja z miejsca frontu rozpuszczalnika

Proponowana przeze mnie procedura przygotowania próbki, ekstrakcji z miejsca frontu rozpuszczalnika na płytce chromatograficznej, może być wykonana zgodnie z następującymi krokami/etapami:

1. Do roztworu próbki dodaje się substancję, która pełni rolę standardu wewnętrznego i część tak otrzymanego roztworu nanosi się np. przy użyciu pipety automatycznej, na płytkę chromatograficzną.
2. Poprzez dwu lub więcej krotne rozwijanie chromatogramu doprowadza się substancje oznaczane i standard wewnętrzny do wspólnej strefy/plamki na płytce chromatograficznej oddzielonej od składników matrycy o większej i mniejszej retencji od substancji oznaczanych oraz standardu wewnętrznego. Przy czym ta wspólna strefa/plamka znajduje się w pozycji frontu rozpuszczalnika po ostatnim etapie rozwijania chromatogramu.

W końcowym etapie składniki próbki i wzorzec wewnętrzny, znajdujące się w miejscu frontu fazy ruchomej po ostatnim rozwijaniu, ekstrahuje się odpowiednim rozpuszczalnikiem przy użyciu przystawki TLC-MS Interface i przenosi otrzymany roztwór próbki do urządzeń analizy instrumentalnej. Etap ekstrakcji można też przeprowadzić w zwykły sposób umieszczając porcję adsorbentu, usuniętego z płytki chromatograficznej z miejsca pozycji frontu rozpuszczalnika, na sączku i wymycie analitów rozpuszczalnikiem do fiolek.

Dodatkowo muszą być spełnione następujące warunki:

- analit/y i wzorzec wewnętrzny muszą być równomiernie (homogenicznie) rozmieszczone w strefie frontu rozpuszczalnika po ostatnim etapie rozwijania.
- liczbę rozwijań chromatogramu niezbędną do sprowadzenia stref analitów oraz standardu wewnętrznego do pozycji frontu rozpuszczalnika można obliczyć, korzystając ze wzoru Perry'ego i współautorów [86], zakładając, że wartość końcowa współczynnika opóźnienia substancji po ostatnim rozwijaniu chromatogramu ma być nie mniejsza niż 0,99.

Analogiczną procedurę można zastosować, używając do rozwijania chromatogramów mieszanin rozpuszczalników, co pozwoli na precyzyjnie dobranie siły elucyjnej fazy ruchomej. Niestety, niesie to pewne ryzyko komplikacji w postaci powstawania gradientu składu fazy ruchomej wzdłuż warstwy adsorbentu oraz powstawania tzw. fałszywych frontów [87]. Zjawisko to można w pewnym stopniu zredukować przez kondycjonowanie warstwy adsorbentu parami rozpuszczalnika [88].

Badania

Oprócz wielu wymagań, które stawia się przed współczesnymi technikami przygotowania próbek, jednym z najważniejszych jest to, aby procedura nie wpływała negatywnie na dokładność końcowych wyników oznaczenia [1-2]. Pierwszym etapem moich badań było więc sprawdzenie, czy procedura SFPE spełnia ten wymóg. Do badań wybrałam prostą próbkę zawierającą pojedynczą substancję (paracetamol) w matrycy biologicznej w postaci surowicy wołowej. Jako wzorzec wewnętrzny zastosowałam acetanilid ze względu na bardzo podobną strukturę chemiczną do paracetamolu, a w konsekwencji – zbliżone właściwości chemiczne i chromatograficzne [H1].

Precyzja i dokładność procedury SFPE jest nieodłącznie związana z faktem, że próbka i standard wewnętrzny muszą być homogenicznie/równomiernie rozmieszczone w strefie pozycji frontu rozpuszczalnika po ostatnim etapie rozwijania [H1]. Jeśli ten warunek jest spełniony, wyniki oznaczania ilościowego będą powtarzalne, niezależnie od tego, czy oznaczaniu zostanie poddana substancja wyekstrahowana z całej jej strefy w końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika, czy tylko z jej fragmentu. Jest to bardzo istotne, jeżeli weźmiemy pod uwagę fakt, że podczas ekstrahowania substancji z płytki głowica przystawki TLC-MS Interface może nie obejmować całej jej strefy/plamki [89].

Pierwszym etapem moich badań było znalezienie odpowiedniego układu faza stacjonarna - faza ruchoma tak, aby sprowadzić strefy obu substancji (paracetamolu i jego standardu wewnętrznego) do pozycji końcowej frontu fazy ruchomej przy jak najmniejszej liczbie rozwijań chromatogramu [H1]. Przeprowadziłam badania zależności retencja - skład dla próbki metanolowej zawierającej paracetamol i acetanilid i jako najlepszy, zarówno pod kątem uzyskania odpowiedniej wartości współczynnika opóźnienia, jak i ekonomicznym, wybrałam układ żel krzemionkowy - metanol. W takim układzie przeprowadziłam kilka strategii rozwijania chromatogramów – pojedyncze oraz dwukrotne, a także rozwijanie chromatogramów w komorze bez pokrywy, co prowadziło do szybszego odparowania rozpuszczalnika z warstwy adsorbentu. Zastosowałam również różne procedury ekstrakcji substancji ze strefy zlokalizowanej w pozycji frontu rozpuszczalnika. Po odparowaniu rozpuszczalnika z płytek chromatograficznych, ekstrahowałam badane substancje dwoma sposobami: bezpośrednio wymywałam substancje z warstwy adsorbentu do fiolek przy wykorzystaniu przystawki TLC-MS Interface firmy Camag [89] oraz wymywałam je do fiolek z adsorbentu umieszczonego na sączku strzykawkowym. W obu przypadkach przeprowadziłam badania nad ekstrakcją substancji z całej strefy warstwy adsorbentu zajmowanej przez plamkę oraz z jej części [90]. We wszystkich omawianych wariantach stosowałam metanol jako ekstrahent. Roztwory z fiolek poddawałam analizie HPLC, a następnie wyznaczałam stosunek pola powierzchni paracetamolu do acetanilidu dla każdej próbki. Uzyskane wyniki porównywałam z wynikami uzyskanymi dla próbki metanolowej, zawierającej acetanilid oraz paracetamol, ale nie poddanej procedurze SFPE, tylko bezpośrednio wprowadzonej do kolumny chromatografu cieczowego. Uzyskane wyniki względnego odchylenia standardowego, RSD, oraz błędu względnego nie przekroczyły 5%, niezależnie czy oznaczane substancje były ekstrahowane z fragmentu, czy z całej strefy substancji. Liczba rozwijań chromatogramu (1 lub 2) również nie wpływała istotnie na otrzymane wyniki [H1].

W następnym etapie badań procedurę zastosowałam do przygotowania próbki z matrycą biologiczną [H1]. W tym celu do surowicy wołowej, fortyfikowanej roztworem paracetamolu, dodałam acetanilidu (standard wewnętrzny), następnie tak sporządzoną próbkę poddałam procedurze SFPE. Zaobserwowałam, że zarówno paracetamol, jak i acetanilid wykazują większą retencję w strefie naniesienia, czyli w plamce próbki surowicy, niż w obszarze plamki uzyskanej po naniesieniu próbki w postaci roztworu metanolowego. Zauważyłam korelacje między współczynnikiem opóźnienia paracetamolu i acetanilidu a stopniem rozcieńczenia surowicy. Współczynnik opóźnienia, R_f , dla obu substancji przy jednokrotnym rozwinięciu

chromatogramu próbki surowicy nierozcieńczonej wynosił 0,5, podczas gdy w przypadku próbki z surowicą rozcieńczoną wodą w stosunku 1:1 około 0,9. Oznaczało to, że w przypadku próbki z matrycą biologiczną, aby uzyskać wąską strefę substancji, w końcowej pozycji frontu fazy ruchomej, konieczne było zastosowanie dwukrotnego rozwijania chromatogramu. Dodatkowo podczas rozwijania chromatogramów zauważyłam efekt nierównomiernego zwilżania strefy/plamki surowicy przez metanol, co skutkowało wytworzeniem się pewnego rodzaju „tunelu”, ponieważ prędkość migracji metanolu w zewnętrznych warstwach strefy/plamki surowicy była większa niż w strefie środkowej. Efekt ten okazał się bardzo korzystny, ponieważ strefa substancji po rozwinięciu chromatogramu była dużo węższa niż strefa startowa zajmowana przez całą plamkę surowicy. Dzięki takiemu efektowi substancje zostały skoncentrowane w małym obszarze, który w całości mógł być pokryty przez głowicę przystawki TLC-MS Interface, i mogły być kompletnie wyekstrahowane do fiolek. Po przeprowadzonej analizie HPLC, analogicznie jak w przypadku próbki metanolowej, porównałam stosunki pola powierzchni pików paracetamolu do standardu, uzyskane dla próbek poddanych przygotowaniu procedurą SFPE, z wynikami otrzymanymi dla próbki bezpośrednio wprowadzonej do chromatografu cieczowego. Podobnie jak w przypadku próbki metanolowej zarówno wartości błędu względnego, jak i RSD nie przekroczyły 5% [H1]. Wyniki te dowiodły, że procedura SFPE może być z powodzeniem zastosowana do oznaczania paracetamolu wobec acetanilidu w próbce biologicznej (surowicy).

W kolejnym etapie badań procedurę SFPE zastosowałam do oznaczania paracetamolu w matrycy biologicznej (surowica wołowa) fortyfikowanej preparatem złożonym Migrastop zawierającym, oprócz paracetamolu, kwas acetylosalicylowy oraz kofeinę [H1]. Zgodnie z założeniami procedury zastosowałam wielokrotne rozwijanie chromatogramu, gdzie pierwszy etap przeprowadziłam stosując rozpuszczalnik (eter) o mniejszej sile elucji niż ta, która jest potrzebna, aby paracetamol oraz wzorzec wewnętrzny migrowały z frontem rozpuszczalnika. Tym samym składniki matrycy o energii adsorpcji mniejszej niż analit oraz standard wewnętrzny (m.in. kwas acetylosalicylowy) migrowały z frontem rozpuszczalnika, co spowodowało ich oddzielenie się od substancji oznaczanej. Podczas drugiego etapu rozwijania chromatogramu, przeprowadzonego na krótszym dystansie niż pierwsze rozwijanie, jako fazę ruchomą zastosowałam metanol, dzięki czemu paracetamol oraz acetanilid utworzyły wąską strefę w pozycji frontu rozpuszczalnika. Kofeina oraz inne składniki matrycy zostały oddzielone od substancji będących przedmiotem zainteresowania, ponieważ wykazywały od nich większą retencję. Po wyekstrahowaniu substancji ze strefy w pozycji frontu

rozpuszczalnika, przeprowadziłam analizę techniką HPLC. Wyniki oznaczenia ilościowego paracetamolu, w tak przygotowanej próbce, były bardzo dobre, wartości błędu względnego oraz RSD nie przekroczyły 3% [H1].

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów stwierdziłam, że niskie wartości RSD oraz błędu względnego, w przypadku porównania stosunku pola powierzchni pików paracetamolu do standardu uzyskanych dla próbek poddanych przygotowaniu procedurą SFPE z wynikami otrzymanymi dla próbki bezpośrednio wprowadzonej do kolumny chromatograficznej chromatografu cieczowego, jak i duża dokładność oraz precyzja oznaczenia ilościowego paracetamolu w próbkach fortyfikowanych preparatem Migrastop dowodzą, że procedura SFPE nie wpływa negatywnie na dokładność końcowych wyników i może być stosowana do oznaczenia paracetamolu w próbkach z matrycą biologiczną, a w dalszej perspektywie, także innych substancji.

Badania te dowiodły również, że wbrew temu, co sugerowali w swojej pracy Oellig i Schwack [83], nie ma przeciwwskazań, aby przeprowadzać poszczególne etapy rozwijania chromatogramu w tym samym kierunku, co więcej — jest to bardzo korzystne, ponieważ pozwala na oddzielenie substancji będących przedmiotem zainteresowania od związków o mniejszej retencji oraz zdecydowanie upraszcza procedurę, a szczególnie jej ewentualną automatyzację. Dodatkowym atutem procedury SFPE, w porównaniu z podejściem zaprezentowanym przez zespół prof. Schwacka, jest fakt, że próbki mogą być nanoszone na warstwę adsorbentu przy użyciu zwykłej ręcznej pipety automatycznej, dzięki czemu nie ma konieczności posiadania automatycznego aplikatora. Te rezultaty sugerują też, że w procedurze SFPE surowe próbki mogą być nanoszone zwykłą pipetą na warstwę adsorbentu w miejscu ich pobierania, a nie w laboratorium wyposażonym w aerzolowy dozownik. Dodatkowo, stosowanie pipety automatycznej pozwala na nanoszenie próbek zanieczyszczonych, czy o dużej lepkości, co jest niewskazane, a często wręcz niemożliwe w przypadku automatycznego aplikatora.

Możliwość nanoszenia próbek za pomocą pipety to nie tylko ułatwienie, ale też pewne wyzwanie związane z faktem, że w przypadku próbek zawierających substancje różniące się budową chemiczną, polarnością, a więc również właściwościami chromatograficznymi, podczas etapu nanoszenia próbki na płytkę chromatograficzną może dojść do tzw. chromatografii krążkowej [91]. W konsekwencji po końcowym etapie rozwijania substancje nie będą równomiernie rozmieszczone w strefie pozycji frontu rozpuszczalnika.

To spowoduje, że wyniki oznaczenia ilościowego będą się różnić w zależności od miejsca w plamce, z którego substancje zostaną wyekstrahowane. W przypadku oznaczania paracetamolu wobec acetanilidu efekt ten nie miał miejsca ze względu na duże podobieństwo (podobną retencję) wzorca wewnętrznego do substancji oznaczanej. Niestety, taka sytuacja nie zawsze jest możliwa, szczególnie w przypadku próbek wieloskładnikowych, gdzie ten sam wzorec jest stosowany dla kilku/kilkunastu substancji. Z tego powodu wyzwaniem wobec moich badań było opracowanie procedury SFPE tak, aby mogła być zastosowana do przygotowania próbki do jednoczesnego oznaczenia wielu substancji, różniących się właściwościami fizykochemicznymi.

Do testów przygotowałam próbkę wieloskładnikową w skład której weszło 8 substancji (paracetamol, kofeina, teofilina, kwas acetylosalicylowy, tramadol, aminofenazon, cyprofloksacyna i acebutolol) oraz acetanilid jako standard wewnętrzny [H2]. Substancje dobrałam tak, aby wartości ich współczynników opóźnienia w układzie żel krzemionkowy - metanol były jak najbardziej zróżnicowane. Roztwory podstawowe wymienionych substancji dodałam do metanolu (próbka metanolowa) oraz surowicy (próbka z matrycą biologiczną). Tak przygotowane próbki naniosłam na płytki chromatograficzne i poddałam procedurze SFPE. Po oznaczeniu ilościowym substancji i porównaniu z wynikami otrzymanymi dla próbki metanolowej bezpośrednio wprowadzonej do urządzenia pomiarowego (HPLC z detektorem DAD) okazało się, że otrzymane wyniki nie są dokładne, o czym świadczyły wysokie wartości błędu względnego dla większości substancji, ani precyzyjne (proc. RSD 1,11– 51,12). Tylko dla paracetamolu błąd względny oraz wartość RSD wynosiły odpowiednio 1,11 i 1,26 [H2]. Wyjaśnieniem takiego zróżnicowania diskutowanych parametrów był efekt chromatografii krążkowej powstający podczas nanoszenia próbek. Efekt ten powodował nierównomierne rozmieszczenie substancji w pozycji frontu rozpuszczalnika. To skutkowało otrzymaniem różnych wartości oznaczania substancji, w zależności od miejsca ekstrakcji ze strefy plamki znajdującej się w końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika. Prawidłowe wyniki oznaczenia uzyskane dla paracetamolu tylko potwierdzają to przypuszczenie, gdyż, jak już powyżej wspomniałam, paracetamol jest substancją o retencji bardzo zbliżonej do acetanilidu, więc podczas nanoszenia próbki na warstwę adsorbentu oba związki są jednakowo rozproszone w strefach plamek na linii startowej oraz końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika procedury SFPE.

W celu wyeliminowania wpływu chromatografii krążkowej na wyniki oznaczenia postanowiłam, przed właściwą procedurą rozwijania, przeprowadzić etap zawężania stref

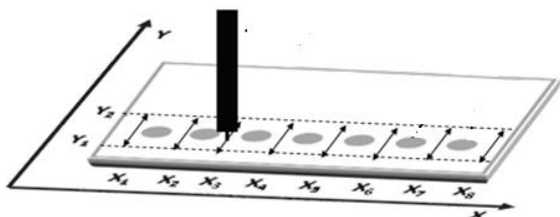
substancji. W tym celu płytkę chromatograficzną pocięłam na mniejsze fragmenty (wąskie paski) tak, aby jeden pasek był przeznaczony dla jednej próbki. Następnie zwilżałam warstwę adsorbentu z naniesioną próbką z dwóch przeciwnych stron, wzdłuż krótszej krawędzi płytki, do jej środka [H2]. Po zawężeniu stref substancji, chromatogram rozwijałam czterokrotnie (próbka metanolowa) lub pięciokrotnie (próbka surowicy) wzdłuż dłuższego boku płytki. Otrzymane wyniki oznaczenia substancji, w próbce tak przygotowanej procedurą SFPE, były dużo lepsze w porównaniu do oznaczania przeprowadzonego z pominięciem procedury zawężania stref substancji - paracetamol, teofilinę, kofeinę, kwas acetylosalicylowy oraz acebutolol udało się oznaczyć z wartościami RSD oraz błędu względnego poniżej 7% [H2]. Niestety, kilku substancji charakteryzujących się dużą retencją, nie można było oznaczyć, ponieważ nawet po 6 rozwijaniach chromatogramu nie udało się sprowadzić ich strefy do końcowej pozycji frontu fazy ruchomej. Zastosowana operacja zwilżania płytki chromatograficznej wzdłuż krótszego jej brzegu pozwala zawęzić obszar strefy startowej, co skutkuje bardziej równomiernym rozmieszczeniem substancji oznaczanych w ich strefie/plamce znajdującej się w pozycji frontu rozpuszczalnika po przeprowadzeniu procedury SFPE. Dzięki temu stosunek stężenia substancji oznaczanych do stężenia wzorca wewnętrznego jest stały, niezależnie od tego, z którego miejsca plamki końcowej wiązki zostaną wyekstrahowane. Ponadto, dzięki procedurze zawężania substancje skoncentrowane są na mniejszym obszarze, który może być prawie całkowicie przykryty przez głowicę przystawki TLC – MS, dzięki czemu czułość metody ulega zwiększeniu.

Zasadność stosowania procedury zawężania stref substancji przed właściwym rozwijaniem zweryfikowałam również na przykładzie innej grupy substancji – kokcydiostatykach. Procedura SFPE, z etapem zawężania stref startowych substancji, została użyta do przygotowania próbek, w celu oznaczenia czterech kokcydiostatyków (narazyna, salinomycyna, robenidyna oraz monenzyna) wobec nigerycyny jako standardu wewnętrznego, w różnych matrycach biologicznych (surowica, pasza zwierzęca) techniką LC-MS [H3]. Dodatkowo, w celu sprawdzenia, czy efekt chromatografii krążkowej występuje w przypadku nanoszenia kokcydiostatyków na płytkę chromatograficzną i czy wpływa negatywnie na końcowy wynik oznaczenia, przeprowadziłam oznaczanie kokcydiostatyków w próbce metanolowej przygotowanej procedurą SFPE, ale z pominięciem etapu zawężania stref substancji. Otrzymane wyniki (stosunek pola powierzchni substancji do pola powierzchni standardu wewnętrznego) porównałam z wynikami otrzymanymi dla próbki bezpośrednio wprowadzonej do aparatu LC-MS/MS, z pominięciem procedury SFPE. Uzyskane dane

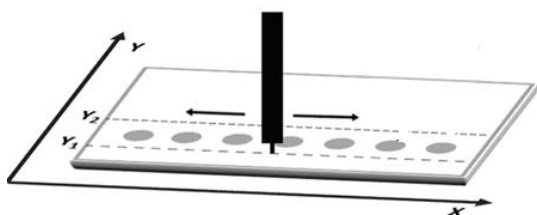
potwierdziły, że również w przypadku próbki zawierającej kokcydiostatyki, na etapie nanoszenia próbki, występuje efekt chromatografii krążkowej, który negatywnie wpływa na precyzję i dokładność otrzymanych wyników (błąd względny wynosił w zależności od substancji od 7 do prawie 70%, podczas gdy RSD mieści się w przedziale 11 – 24%) [H3]. Natomiast przeprowadzenie procedury zawężania stref startowych substancji, przed właściwym etapem rozwijania chromatogramów podczas procedury SFPE, spowodowało znaczącą poprawę parametrów oznaczania. Dla wszystkich substancji, z wyjątkiem robenidyny, procentowe wartości błędu względnego wynosiły od 1,99 do 7,34 (próbka metanolowa), od 3,13 do 14,83 (próbka surowicy) oraz od 0,44 do 5,00 (próbka paszy zwierzęcej). Wartość RSD nie przekroczyła 5%, bez względu na rodzaj matrycy, w której oznaczane były substancje [H3]. Uzyskane wyniki dowodzą, że opracowana przez mnie procedura, wstępnego zawężania stref substancji, efektywnie eliminuje skutki chromatografii krążkowej, bez względu na rodzaj substancji będących przedmiotem oznaczania. Dzięki temu nie ma żadnych przeciwwskazań, aby nawet wieloskładnikowe próbki były przygotowywane do analizy instrumentalnej z zastosowaniem procedury SFPE. Badania te również potwierdziły fakt, że nie ma żadnych ograniczeń, aby próbki substancji nanosić na płytki chromatograficzne w prosty sposób, z użyciem np. pipety półautomatycznej.

Po rozwiązaniu problemu związanego z występowaniem chromatografii krążkowej, na tym etapie badań największym ograniczeniem procedury SFPE była duża liczba operacji manualnych. Przycinanie płytek na mniejsze kawałki/paski, w celu zawężenia stref substancji, oraz konieczność rozwijania kilku chromatogramów na oddzielnych płytkach/paskach znacząco wydłużały czas procedury oraz czyniły ją znużającą. Będąc świadomą, że możliwość automatyzacji techniki przygotowania próbek czyni ją bardziej atrakcyjną dla zastosowań laboratoryjnych, w dalszym etapie badań postanowiłam do przeprowadzenia procedury SFPE, zaadaptować prototyp komory poziomej z dystrybutorem eluentu, ruchomą pipetą, sterowaną maszyną 3D, dzięki któremu procedura SFPE stała się półautomatyczną [H4]. Przy wykorzystaniu tego urządzenia, ruchoma pipeta porusza się wzdłuż 3 osi z różnymi prędkościami, co umożliwia dostarczanie fazy ruchomej w dowolne miejsce na płycie chromatograficznej i rozwijanie chromatogramów w dowolnym pożądanym kierunku. Dzięki temu jest możliwe rozwijanie chromatogramów jednocześnie w dwóch kierunkach. To nowe rozwiązanie pozwoliło na znaczne skrócenie czasu prowadzenia procedury SFPE.

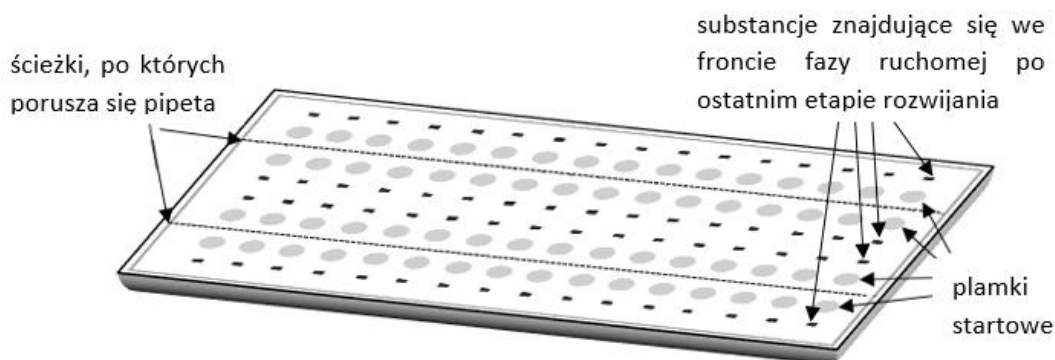
Możliwość dostarczania fazy ruchomej do dowolnego miejsca na płytce chromatograficznej czyni technikę SFPE przyjaźniejszą dla użytkownika, jednocześnie oferuje wiele metodycznych rozwiązań, które są niedostępne w przypadku stosowania klasycznej techniki rozwijania chromatogramów w komorach poziomych DS do TLC. Pozwala na zawężanie stref/plamek substancji bez konieczności cięcia płytek na małe fragmenty (Rys. 1, krótkie ścieżki przesuwania się pipety to: X_1, X_2, \dots), umożliwia rozwijanie chromatogramów w sposób klasyczny, dostarczając eluent przed strefę substancji (Rys. 2, pipeta przesuwa się tam i z powrotem wzdłuż linii/ścieżki Y_1), ale także rozwijanie z dostarczaniem eluentu poza strefą naniesionej substancji (Rys. 2, pipeta przesuwa się wzdłuż linii Y_2), stwarza możliwości analizowania wielu próbek na jednej płytce chromatograficznej (Rys. 3). To tylko niektóre warianty, które można stosować w procedurze SFPE z wykorzystaniem ruchomej pipety, sterowanej maszyną 3D, do rozwijania chromatogramów.



Rys. 1. Schemat operacji zawężania stref substancji za pomocą roztworu fazy ruchomej dostarczanej z pipety, przesuwanej nad warstwą adsorbentu, sterowanej maszyną 3D.



Rys. 2. Schemat operacji rozwijania chromatogramów za pomocą roztworu fazy ruchomej dostarczanej przed strefę naniesionych próbek (Y_1) oraz za strefę dozowania (Y_2) z pipety.



Rys. 3. Schemat operacji rozwijania chromatogramów wielu próbek za pomocą roztworu fazy ruchomej dostarczanego z pipety przesuwanej nad warstwą adsorbentu i sterowanej maszyną 3D.

W kolejnym etapie badań postanowiłam więc przeprowadzić procedurę SFPE przygotowania próbki do analizy techniką LC-MS z zastosowaniem rozwijania chromatogramów z dostarczaniem rozpuszczalnika rozwijającego do warstwy adsorbentu pipetą poruszaną maszyną 3D [H4]. Dzięki zastosowaniu maszyny 3D mogłam wykonać procedurę zawężania stref wszystkich naniesionych próbek bez konieczności cięcia płytki na małe fragmenty. Dodatkowo tylko pierwsze rozwijanie chromatogramu przeprowadzałam dostarczając fazę ruchomą poniżej linii startowej (jak w przypadku rozwijania chromatogramu w klasycznej komorze DS), natomiast każde kolejne rozwijanie prowadziłam doprowadzając fazę ruchomą powyżej miejsca naniesienia substancji. Dzięki temu unikałam niebezpieczeństwa ciągłego wymywania składników niepożądanych z matrycy. Co też istotne - zastosowanie takiej procedury rozwijania wpłynęło na znaczne skrócenie czasu analizy, poprzez zmniejszenie dystansu rozwijania chromatogramu. Otrzymane wyniki dokładności i precyzji oznaczenia substancji wyekstrahowanych z płytek, po przeprowadzeniu procedury SFPE z użyciem maszyny 3D, nie różniły się znacząco od tych, otrzymanych w przypadku zastosowania zwykłego rozwijania [H4], ale z pewnością mniejsza liczba operacji manualnych, krótszy czas analizy oraz niższe zużycie rozpuszczalników sprawiły, że tak przeprowadzona procedura SFPE stała się bardziej przyjazna dla użytkownika i środowiska. Poza tym jest to znaczny krok w kierunku pełnej jej automatyzacji.

Dysponując urządzeniem znacznie usprawniającym przeprowadzanie procedury SFPE, w kolejnym etapie badań postanowiłam zoptymalizować tę procedurę tak, aby możliwe było oznaczenie wszystkich substancji wchodzących w skład skomplikowanej próbki testowej, czego nie udało się osiągnąć w badaniach przedstawionych w pracach H2 i H4. Jak

wspominałam wcześniej, składniki próbki testowej zostały tak dobrane, by różniły się właściwościami fizykochemicznymi, co oznacza, że i chromatograficznymi również. Tym samym opracowanie procedury SFPE dla złożonej próbki, w celu dokładnego i precyzyjnego oznaczenia wszystkich analitów byłoby dowodem na to, że uda się tego dokonać i w stosunku do innej wieloskładnikowej próbki biologicznej.

W dotychczasowych badaniach do przygotowania próbek z zastosowaniem procedury SFPE używałam żelu krzemionkowego jako fazy stacjonarnej oraz metanolu jako fazy ruchomej. Wiadomym jest, że retencja i selektywność w chromatografii zależą (między innymi) od zastosowanych faz, stacjonarnej i ruchomej [92-96]. Zatem, w celu sprowadzenia stref wszystkich analitów do pozycji frontu fazy ruchomej, należało właściwie zoptymalizować układ chromatograficzny z uwzględnieniem wymienionych czynników. Przeprowadziłam więc badania retencji substancji w układach z różnymi fazami stacjonarnymi, zaczynając od niepolarnych (żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, C18), przez te o umiarkowanej polarności (żel krzemionkowy modyfikowany grupami cyjanowymi, aminowymi oraz diolowymi) kończąc na adsorbentach o wysokiej polarności (żel krzemionkowy, tlenek glinu) oraz z metanolem jako fazą ruchomą [H5]. Uzyskane wyniki potwierdziły wpływ zastosowanej fazy stacjonarnej na retencję badanych substancji. W przypadku zastosowania adsorbentu typu C18 tylko strefy 5 związków można było sprowadzić do pozycji frontu rozpuszczalnika, po czterokrotnym rozwinięciu chromatogramu. W przypadku faz nieruchomych o wysokiej polarności (żel krzemionkowy i tlenek glinu) strefy 6 z 9 związków znalazły się w pozycji frontu fazy ruchomej po takiej samej liczbie rozwijań. Zastosowanie adsorbentów typu Diol i CN pozwoliło doprowadzić aż 8 z 9 związków do pozycji frontu fazy ruchomej. Otrzymane wyniki dowiodły, że procedura SFPE z zastosowaniem powyższych układów może być użyteczna do rozdzielania i selektywnego oznaczania wybranych związków [H5]. Stosując np. układ chromatograficzny składający się z fazy stacjonarnej typu C18 oraz metanolu jako fazy ruchomej, można oznaczyć takie związki jak paracetamol, acetanilid, teofilina, kwas acetylosalicylowy, kofeina, podczas gdy inne związki jak aminofenazon, tramadol, cyprofloksacyna i acebutolol oraz pozostałe składniki matrycy będą od nich oddzielone. Otrzymane wyniki pokazały również że fazy stacjonarne typu CN i Diol mają największy potencjał, jeśli chodzi o możliwość oznaczania wszystkich składników próbki testowej. Z tego powodu te adsorbenty oraz żel krzemionkowy, jako najtańszy i najbardziej popularny adsorbent w praktyce laboratoryjnej, wybrałam do dalszego etapu badań. Mimo zastosowania różnych faz stacjonarnych oraz czystych rozpuszczalników

organicznych jako faz ruchomych, nie było możliwe doprowadzenie stref wszystkich związków badanych do końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika, ponieważ substancje, szczególnie cyprofloksacyna, wykazywały w stosowanych układach bardzo silną retencję. Jak wiadomo, do kontrolowania retencji i selektywności w chromatografii cieczerwowej często stosuje się zmianę pH fazy ruchomej [97-98]. Dlatego w celu znalezienia układu pozwalającego na doprowadzenie stref wszystkich związków oznaczanych do końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika wydawało się celowe zastosowanie buforowanej fazy ruchomej. Dla wybranych faz stacjonarnych przeprowadziłam badania zależności retencji substancji od składu użytego eluentu [H5]. Jako fazy ruchome zastosowałam mieszaniny metanolu z buforami w zakresie pH 3,0 - 10,0. Badany zakres stężenia metanolu w eluencie wynosił od 50 do 90% v/v. Na podstawie uzyskanych wyników, za optymalne układy chromatograficzne uznałam te z żelem krzemionkowym oraz adsorbentem typu Diol, a także fazą ruchomą złożoną z 50% v/v metanolu w buforze, pH 3,0. W tych układach związki charakteryzowały się niską retencją, dlatego wszystkie strefy badanych substancji można było doprowadzić do końcowej pozycji frontu fazy ruchomej już po dwukrotnym rozwinięciu chromatogramu. W przypadku zastosowania układów z buforami o wartościach pH wyższych od 3,0, obserwowałam efekt ogonowania substancji. Z kolei zastosowanie faz ruchomych o wyższym stężeniu metanolu skutkowało niższymi wartościami współczynnika opóźnienia, szczególnie cyprofloksacyny. To powodowało, że liczba rozwijań chromatogramu, pozwalająca otrzymać strefy wszystkich substancji w końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika, była większa niż w przypadku zastosowania układów z niższą zawartością metanolu [H5].

Procedura SFPE zastosowana do przygotowania próbek metanolowych w celu oznaczania substancji techniką LC-MS/MS polegała na trzykrotnym rozwinięciu chromatogramu fazą ruchomą złożoną z 50% metanolu i 50% buforu, pH 3,0 (v/v). Otrzymane wyniki oznaczenia były bardzo zadowalające, udało się oznaczyć wszystkie substancje obecne w próbce, otrzymując niskie wartości RSD i błędu względnego [H5]. Jedynie dla aminofenazonu oraz 4-aminoantypiryny wyniki te były niekorzystne, prawdopodobnie ze względu na dużą wrażliwość tych substancji na światło, co potwierdzają dane literaturowe [99].

Jak wspomniałam powyżej, głównym celem tego etapu badań było pokazanie, że możliwe jest oznaczenie wszystkich badanych związków w próbce zawierającej skomplikowaną matrycę biologiczną (surowicę), więc analogiczną procedurę zastosowałam do oznaczenia substancji w próbce z taką matrycą. Niestety, okazało się, że wybrana faza ruchoma nie eluuje cyprofloksacyny ze strefy/plamki startowej surowicy. Nawet po trzykrotnym

rozwinięciu chromatogramu, cyprofloksacyna nadal znajdowała się w strefie surowicy [H5]. Kolejne eksperymenty wykazały, że w celu wymycia cyprofloksacyny ze strefy naniesienia próbki, należy zastosować fazę ruchomą o wyższym stężeniu modyfikatora organicznego. Najlepsze efekty uzyskałam, stosując eluent składający się z metanolu i buforu, pH 3,0, w stosunku objętościowym 9:1. W takim układzie cyprofloksacyna (ale także inne związki) była silnie eluowana z miejsca naniesienia próbki. Niestety, chociaż ta faza ruchoma była odpowiednia do elucji tego związku ze strefy/plamki surowicy, nie nadawała się do rozwijania chromatogramów, ponieważ, jak wspomniano, ponieważ w takim układzie cyprofloksacyna wykazuje silną retencję. Stąd, w celu opracowania odpowiedniej procedury SFPE, zapewniającej doprowadzenie stref wszystkich związków do końcowej pozycji frontu rozpuszczalnika, przy możliwie jak najmniejszej liczbie rozwijań chromatogramu, przeprowadziłam również optymalizację warunków elucji [H5]. Okazało się, że najlepsze wyniki uzyskałam, stosując procedurę z gradientem skokowym stężenia fazy ruchomej. W pierwszym etapie trzykrotnie rozwijałam chromatogram fazą ruchomą składającą się z 90% v/v metanolu w buforze o pH 3,0. Kolejne dwa rozwijania przeprowadzałam przy użyciu fazy ruchomej złożonej z 50% v/v metanolu w buforze, pH 3,0. Faza ruchoma zawierająca 90% v/v metanolu umożliwiła elucję związków ze strefy matrycy, podczas gdy faza zawierająca 50% v/v metanolu w buforze o pH 3,0 zapewniła bardzo dobrą migrację związków badanych poza strefą surowicy. Stosując taką procedurę udało się, podobnie jak w przypadku próbki metanolowej, sprowadzić strefy wszystkich związków do końcowej pozycji frontu fazy ruchomej. Po ich ekstrakcji i oznaczeniu techniką LC-MS/MS okazało się, że wartości błędu względnego oraz RSD nie przekraczają 6%, zarówno w układzie z fazą stacjonarną typu Diol, jak i z żelem krzemionkowym (wyjątkiem są aminofenazon oraz 4-aminoantypiryna, efekt ten został wyjaśniony powyżej) [H5]. Wyniki te dowiodły, że metoda SFPE może być z powodzeniem stosowana do przygotowywania wieloskładnikowych próbek biologicznych.

Przedstawione dotychczas wyniki eksperymentów dowiodły, że zastosowanie procedury SFPE do przygotowania próbek nie powoduje istotnego zwiększenia błędu oznaczania substancji w stosunku do próbki bezpośrednio oznaczanej techniką LC lub LC-MS, tzn. z pominięciem tej procedury, a szeroki wybór komercyjnych faz stacjonarnych i ruchomych umożliwia dobranie odpowiedniego układu do oznaczenia substancji nawet różniących się w dużym stopniu właściwościami chromatograficznymi oraz fizykochemicznymi. Poprzez zastosowania pipety poruszanej maszyną 3D, do dostarczania eluentu do warstwy adsorbentu, procedura została częściowo zautomatyzowana, a tym samym

jest mało czasochłonna i pracochłonna. Jednakże próbki, w których do tej pory były oznaczane substancje, były próbkami testowymi – przygotowanymi specjalnie na potrzeby badań [H1-H5]. W ostatnim etapie badań pozostało więc zastosowanie procedury SFPE do przygotowania rzeczywistej próbki.

Procedura SFPE została użyta do przygotowania próbek klinicznych do oznaczania tryptofanu w osoczu [H6]. Wszystkie operacje związane z bezpośrednim kontaktem z materiałem biologicznym zostały wykonane przy współpracy z laboratorium klinicznym Samodzielnego Publicznego Szpitala Klinicznego Nr 4 w Lublinie. W tym celu krew o objętości około 2 - 5 ml została pobrana od pacjentów do probówek z antykoagulantem. Po odwirowaniu próbek oddzielono osocze, dodano do niego [13C11, 15N2]-L-tryptofan, jako standard wewnętrzny, po czym próbki dokładnie wymieszano. Na płytkę typu Diol o wymiarach 10 × 10 cm naniosłam pipetą automatyczną w dwóch rzędach, równoległych do jednego z boków, 12 próbek osocza, każda po około 2 µl. Tak przygotowaną płytkę pozostawiłam na 5 minut w celu odparowania rozpuszczalnika próbki. Z uwagi na zastosowanie standardu wewnętrznego znakowanego, nie było konieczności zastosowania procedury zawężania stref substancji przed właściwym rozwijaniem (duże podobieństwo w budowie strukturalnej gwarantuje homogeniczne rozmieszczenie obu związków w strefie dozowania, co zostało udowodnione w pracy H1). Pierwszy etap rozwijania chromatogramu przeprowadziłam roztworem metanolu z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego, na takim dystansie, aby czoło fazy ruchomej po skończonym rozwijaniu znajdowało się ok. 5 – 10 mm za strefą naniesienia próbek. Rozwijanie miało na celu wymycie substancji oznaczanej oraz standardu wewnętrznego poza strefę startową (wymycie substancji ze strefy osocza). Do dostarczania fazy ruchomej do warstwy adsorbentu zastosowałam maszynę 3D. Wydajność dostarczania roztworu fazy ruchomej oraz prędkość przesuwu pipety zostały odpowiednio zoptymalizowane.

Po odparowaniu rozpuszczalnika fazy ruchomej ponownie rozwinęłam chromatogramy. W tym etapie zastosowałam fazę ruchomą o mniejszej sile elucji niż konieczna do otrzymania stref substancji badanej oraz wzorca wewnętrznego we froncie rozpuszczalnika (35% toluenu w metanolu (z 0.1% dodatkiem kwasu mrówkowego)). Dzięki temu składniki matrycy o mniejszej retencji od tryptofanu i standardu wewnętrznego oddzieliłam od substancji będących przedmiotem zainteresowania [H6]. W kolejnym etapie procedury SFPE sprowadziłam strefy tryptofanu oraz standardu wewnętrznego do wspólnego miejsca we froncie rozpuszczalnika. W tym celu rozwinęłam chromatogramy, stosując metanol z 0,1% dodatkiem

kwasu mrówkowego, na dystansie o połowę krótszym niż zastosowany w poprzednim etapie rozwijania. Następnie tryptofan i jego wzorzec wewnętrzny, znajdujące się we wspólnym miejscu zlokalizowanym w pozycji frontu fazy ruchomej, wyekstrahowałam roztworem metanolu z 0,1% dodatkiem kwasu mrówkowego, przy użyciu przystawki TLC-MS Interface. Zastosowałam dwa warianty wykonania tej ekstrakcji: offline i online. W wariacie offline zbierałam roztwór do fiolek, a następane substancje obecne w roztworze oznaczałam techniką LC-MS/MS, a także tylko techniką MS z pominięciem chromatografii cieczowej. Wariant online polegał na bezpośrednim dostarczaniu/kierowaniu ekstraktu z przystawki TLC-MS Interface do spektrometru mas [H6].

Jako procedurę odniesienia, w procesie przygotowania próbki, zastosowałam precypitację białek i następnie oznaczenie techniką LC-MS/MS. Wyniki uzyskane w ten sposób traktowałam jako referencyjne, do których zostały porównane wyniki uzyskane przy zastosowaniu procedury SFPE. Porównując wyniki uzyskane przy zastosowaniu procedury odniesienia z tymi uzyskanymi przy zastosowaniu procedury SFPE, zauważyłam, że zarówno wartości błędu względnego, jak i RDS nie przekraczają 5%, bez względu na to jaką technikę zastosowałam (SFPE-MS/MS, SFPE-LC-MS/MS czy SFPE - MS/MS). Również wartości LOD i LOQ były porównywalne. Dodatkowym atutem zastosowania procedury SFPE był fakt, że próbka przygotowana techniką SFPE była wolna od większości składników matrycy, co można było zauważyć, porównując chromatogramy próbki przygotowanej procedurą odniesienia oraz procedurą SFPE. Na chromatogramach próbki przygotowanej procedurą odniesienia widać wiele pików pochodzących od zanieczyszczeń [H6].

Obecność zanieczyszczeń w próbce poddawanej analizie MS jest bardzo niekorzystna, ponieważ powoduje tzw. efekt matrycy - wzmacnianie lub supresję jonizacji analitów, spowodowane obecnością innych składników próbki w źródle jonów spektrometru mas. Aby zminimalizować wpływ efektu matrycowego na wyniki oznaczeń, analiza MS musi być poprzedzona chromatografią kolumnową, a to znacznie wydłuża czas analizy. Obecność zanieczyszczeń w próbce wpływa również niekorzystnie na stan aparatury pomiarowej, zmuszając użytkownika do częstych konserwacji/napraw, a w skrajnych przypadkach nawet do wymiany sprzętu.

W przypadku próbek przygotowanych procedurą SFPE etap chromatografii kolumnowej może być z powodzeniem pominięty, ponieważ ze względu na bardzo dobre oczyszczenie próbki, ilość/liczba substancji interferujących jest w niej znikoma. Dzięki temu

zarówno czas analizy, jak i jej koszt mogą ulec znacznemu zmniejszeniu w porównaniu do analizy, gdy do jej wykonania jest włączona technika HPLC. W zastosowanej procedurze odniesienia można było jednocześnie przygotowywać 24 próbki (ograniczenie wynikające z liczby miejsc w wirówce), co pozwalało uzyskać czas analizy około 17 minut/próbkę. W przypadku jednoczesnego przygotowania 32 próbek procedurą SFPE (ograniczenie wynikające z rozmiaru płytki chromatograficznej) czas ten uległ znacznemu skróceniu, nawet do 4 - 5 minut/próbkę w wariacie SFPE-MS (bez udziału techniki HPLC). Ma to miejsce zarówno w przypadku, gdy roztwory substancji kierowałam z płytki chromatograficznej, za pomocą przystawki TLC-MS Interface, bezpośrednio do spektrometru mas, jak i gdy po ekstrakcji te roztwory umieszczałam w fiolkach, a następnie po wstawieniu do autosamplera, poddawałam analizie techniką MS/MS [H6]. Należy tu też podkreślić, że w przypadku analizy techniką LC-MS/MS, do której próbki byłyby przygotowane zgodnie z procedurą SFPE czas takiej analizy mógłby być również krótszy niż 17 min dla próbki przygotowanej procedurą odniesienia. Jak wspominałam powyżej, próbka po procedurze SFPE jest bardzo dobrze oczyszczona, więc stosowanie po każdej analizie elucji gradientowej do wymycia zanieczyszczeń z kolumny nie jest już konieczne, a zatem etap doprowadzania kolumny do stanu równowagi przed następną analizą, można pominąć. W takim przypadku czas analizy wynosiłby 7,5 minuty. Skrócenie czasu analizy prowadzi nie tylko do zwiększenia jej przerobu, ale również do zmniejszenia kosztów wynikających chociażby z mniejszego zużycia odczynników. W przypadku zastosowania procedury SFPE-MS zużycie rozpuszczalnika jest ponad 4 razy mniejsze w porównaniu do procedury odniesienia stosowanej w badaniach [H6]. Jest to korzystne nie tylko ze względu ekonomicznego, ale również ekologicznego. Co więcej, tak przeprowadzona procedura oznaczania tryptofanu jest bardzo łatwa do zautomatyzowania.

Przedstawiony cykl publikacji [H1–H6] jest udokumentowanym opracowaniem osiągnięcia naukowego, obejmującego badania nad nowatorską procedurą przygotowania próbek, szczególnie pochodzenia biologicznego, do analizy technikami instrumentalnymi. W procedurze tej z powodzeniem została zastosowana ekstrakcja ciecz – ciało stałe substancji oznaczanych z pozycji frontu rozpuszczalnika na warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej.

Otrzymane wyniki badań, opisane w pracach tworzących jednotematyczny blok publikacji, pozwalają na następujące podsumowanie mojego osiągnięcia naukowego:

1. Chromatografia cienkowarstwowa może być z powodzeniem wykorzystana w celu przygotowania próbek biologicznych do analizy ilościowej technikami instrumentalnymi.
2. Zastosowanie procedury ekstrakcji ciecz-ciało stałe wobec analitów i standardu wewnętrznego, z ich strefy znajdującej się w pozycji frontu rozpuszczalnika na warstwie adsorbentu płytki chromatograficznej, pozwala na otrzymanie parametrów walidacyjnych analizy porównywalnych do tych uzyskiwanych we współczesnej analizie technikami instrumentalnymi.
3. Wyniki badań dowodzą, że zastosowanie procedury SFPE, jako techniki przygotowania próbek, pozwala na uzyskanie dokładnego oznaczania analitów, co zostało potwierdzone poprzez porównanie z wynikami uzyskanymi z wykorzystaniem procedury odniesienia uznanej i stosowanej we współczesnej praktyce laboratoryjnej.
4. Poprzez dobranie odpowiedniego układu chromatografii planarnej, faza stacjonarna - faza ruchoma, stosowanego w procedurze SFPE, możliwe jest przygotowanie wieloskładnikowych próbek zawierających związki o różnej budowie i właściwościach fizykochemicznych. Wyniki oznaczenia substancji w tak przygotowanych próbkach, współczesnymi technikami instrumentalnymi, są dokładne i precyzyjne.
5. Częściowe zautomatyzowanie procedury SFPE znacznie zmniejsza liczbę operacji manualnych, czego efektem jest skrócenie czasu analizy, zmniejszenie zużycia rozpuszczalników stosowanych w procesie przygotowania próbki oraz czyni ją bardziej przyjazną dla użytkownika i środowiska.
6. Próbki uzyskiwane techniką SFPE są w bardzo dużym stopniu oczyszczone od składników matrycy wykazujących większą i mniejszą retencję od analitów i standardu wewnętrznego.
7. Próbki przygotowane techniką SFPE mogą być bezpośrednio dozowane do spektrometru mas, z pominięciem ich rozdzielania innymi technikami chromatografii cieczowej, np. HPLC. Stosowanie tego podejścia również przyczynia się do skrócenia czasu analizy i zmniejszenia zużycia rozpuszczalników.
8. Dokładne i precyzyjne wyniki oznaczenia tryptofanu w próbkach osocza ludzkiego, przygotowanych procedurą SFPE, potwierdzają, że technika ta może być stosowana

w celu przygotowania próbek klinicznych do oznaczania substancji biologicznie aktywnych.

Tematykę przedstawioną w publikacjach cyklu, uważam za nowatorską. Opracowana technika rokuje bardzo dobrze na jej wykorzystanie w praktyce laboratoryjnej. Przemawiają za tym bardzo dobry stopień oczyszczenia próbki, zautomatyzowanie procedury, niewielka objętość próbki konieczna do przeprowadzenia oznaczenia, minimalne zużycie rozpuszczalników oraz skrócenie czasu analizy. Cechy te są wystarczające, aby utwierdzać w przekonaniu, że technika SFPE może być konkurencyjna w stosunku do obecnie stosowanych w obszarze przygotowania próbek biologicznych do analizy instrumentalnej.

Literatura:

[H1] ANNA KLIMEK-TUREK, MATEUSZ SIKORA, MACIEJ RYBICKI, TADEUSZ H. DZIDO. Frontally eluted components procedure with thin layer chromatography as a mode of sample preparation for high performance liquid chromatography quantitation of acetaminophen in biological matrix. *J. Chromatogr. A* 2016 vol. 1436 s. 19-27. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.01.053

[H2] ANNA KLIMEK-TUREK, EWA SIKORA, TADEUSZ H. DZIDO. Solvent front position extraction procedure with thin-layer chromatography as a mode of multicomponent sample preparation for quantitative analysis by instrumental technique. *J. Chromatogr. A* 2017 vol. 1530 s. 204-210. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.11.042

[H3] ANNA KLIMEK-TUREK, KAMILA JAGLIŃSKA, MAGDALENA IMBIEROWICZ, TADEUSZ H. DZIDO. Solvent front position extraction with semi-automatic device as a powerful sample preparation procedure prior to quantitative instrumental analysis. *Molecules* 2019 vol. 24 nr 7 [art. nr] 1358, s. 1-13. DOI: 10.3390/molecules24071358

[H4] ANNA KLIMEK-TUREK, MACIEJ RYBICKI, ALEKSANDRA GIERACH, WALDEMAR KOROL, TADEUSZ H. DZIDO. Solvent front position extraction procedure for preparation of biological samples with coccidiostats for liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination. *J. Planar Chromatogr.* 2019 vol. 32 nr 3 s. 183-189. DOI:

[H5] ANNA KLIMEK-TUREK, MARIKA MICHALSKA, ALEKSANDRA CHWALCZUK, TADEUSZ H. DZIDO. Optimization of the procedure of solvent front position extraction for preparation of multi-component sample for instrumental analysis. *J. Chromatogr. A* 2020 vol. 1618 [art. nr] 460912, s. 1-8. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.460912

[H6] ANNA KLIMEK-TUREK, ADAM CHOMICKI, EMILIA FORMAL, ANNA PRADIUCH, MICHAŁ HYS, TADEUSZ H. DZIDO. Solvent front position extraction with semi-automatic device as a powerful sample preparation procedure to quantitation of tryptophan in human plasma. *Scientific Reports* [online] 2020 vol. 10, art. nr 15063, s. 1-11. DOI: 10.1038/s41598-020-71846-6.

- [1] Pawliszyn J., Lord H. L., (Editors) (2010) Handbook of Sample Preparation, Wiley-Blackwell, USA
- [2] Majors R. E. (2013) Sample Preparation Fundamentals for Chromatography; Agilent Technologies, Mississauga, Canada,.
- [3] Singleton C. (2012). Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC–MS analysis. *Bioanalysis*, 4(9), 1123–1140. doi:10.4155/bio.12.73
- [4] Richter BE. Current trends and developments in sample preparation. *LC-GC* 1999; 17(6S): S22–S28.
- [5] Filippou O., Bitas D., Samanidou V. (2017). Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B*, 1043, 44–62. doi:10.1016/j.jchromb.2016.08.040
- [6] Moldoveanu S. C., David V.(2002) Sample Preparation in Chromatography, *Journal of Chromatography Library*. 65, 3-111.
- [7] LCGC Editors. (2015). Overview of Sample Preparation. *LCGC* 33, 46-51.
- [8] Nováková L. (2016). Advances in Sample Preparation for Biological Fluids. *LCGC* 29, 9–15.
- [9] Hyötyläinen T. (2009). Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 743–758. doi:10.1007/s00216-009-2772-2
- [10] White B., McDowall R. D. (2018). Sample Handling: Automated Sample Preparation. Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.00480-7
- [11] Mitra s. (Editor) (2003) Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Wiley&Sons. U.S.A.
- [12] Niu Z., Zhang W., Yu C., Zhang J., Wen Y. (2018). Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 123–146. doi:10.1016/j.trac.2018.02.005
- [13] Saito Y., Nakagami K. (2020). Sample preparation for the analysis of drugs in biological fluids. *Methods of Therapeutic Drug Monitoring Including Pharmacogenetics*, 1–13. doi:10.1016/b978-0-444-64066-6.00001-0
- [14] Cacciola F., Maimone M., Dugo P., Mondello L. (2017). Green Sample-Preparation Techniques in Comprehensive Two-Dimensional Chromatography. *Green Extraction Techniques - Principles, Advances and Applications*, 601–623. doi:10.1016/bs.coac.2016.12.003
- [15] Wardencki W., Curyło J., Namieśnik J. (2007). Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 275–288. doi:10.1016/j.jbbm.2006.07.004
- [16] Pan J., Zhang C., Zhang Z., Li G. (2014). Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 815, 1–15. doi:10.1016/j.aca.2014.01.017
- [17] Maciel E. V. S., de Toffoli A. L., Lanças F. M. (2018). Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. *Journal of Separation Science*. doi:10.1002/jssc.201800824

- [18] Wells D.A. Automation tools and strategies for bioanalysis. In: High throughput bioanalytical sample preparation: methods and automation strategies. Amsterdam: Elsevier; 2003. p. 135 e 97.
- [19] Wells D.A, Lloyd TL. Automation of sample preparation for pharmaceutical and clinical analysis. In: Pawliszyn J, editor. Sampling and sample preparation for field and laboratory, vol. 37. Amsterdam: Elsevier;
- [20] Fischbach F. T., Dunning M. B. (2009). A manual of laboratory and diagnostic tests. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- [21] Gika H., Theodoridis G. (2011). Sample preparation prior to the LC–MS-based metabolomics/metabonomics of blood-derived samples. *Bioanalysis*, 3(14), 1647–1661. doi:10.4155/bio.11.122
- [22] Bruns D. E., Ashwood E. R., Burtis C. A. Fundamentals of Molecular Diagnostics, Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis (5th edition) Elsevier, St. Louis, USA, 2012
- [23] Dembińska-Kieć A., Naskalski J. W., Solnica B. Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Edra Urban & Partner Wydawnictwo Wrocław 2017, wyd.4
- [24] Wells D. A. (2018). Sample Preparation for Mass Spectrometry Applications. Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry, 67–91. doi:10.1016/b978-0-12-816063-3.00003-7
- [25] Panuwet, P., Hunter, R. E., D'Souza, P. E., Chen, X., Radford, S. A., Cohen, J. R., Barr, D. B. (2015). Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 46(2), 93–105. doi:10.1080/10408347.2014.980775
- [26] Li, F., Ewles, M., Pelzer, M., Brus, T., Ledvina, A., Gray, N., Blackburn, M. (2013). Case studies: the impact of nonanalyte components on LC–MS/MS-based bioanalysis: strategies for identifying and overcoming matrix effects. *Bioanalysis*, 5(19), 2409–2441. doi:10.4155/bio.13.201
- [27] Marchi, I., Viette, V., Badoud, F., Fathi, M., Saugy, M., Rudaz, S., Veuthey, J. L. (2010). Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4071–4078. doi:10.1016/j.chroma.2009.08.061
- [28] Bergeron, A., & Garofolo, F. (2013). Importance of matrix effects in LC–MS/MS bioanalysis. *Bioanalysis*, 5(19), 2331–2332. doi:10.4155/bio.13.237
- [29] Côté, C., Bergeron, A., Mess, J.-N., Furtado, M., & Garofolo, F. (2009). Matrix effect elimination during LC–MS/MS bioanalytical method development. *Bioanalysis*, 1(7), 1243–1257. doi:10.4155/bio.09.117
- [30] Ismaiel, O. A., Halquist, M. S., Elmamly, M. Y., Shalaby, A., & Karnes, H. T. (2007). Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 859(1), 84–93.
- [31] Xia, Y.-Q., & Jemal, M. (2009). Phospholipids in liquid chromatography/mass spectrometry bioanalysis: comparison of three tandem mass spectrometric techniques for monitoring plasma phospholipids, the effect of mobile phase composition on phospholipids elution and the association of phospholipids with matrix effects. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(14), 2125–2138. doi:10.1002/rcm.4121

- [32] Di Palma, S., Alfieri, A., Bonelli, F., & Monteagudo, E. (2009). A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC–ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 50(5), 867–871. doi:10.1016/j.jpba.2009.05.037
- [33] Soltani, S., & Jouyban, A. (2014). Biological sample preparation: attempts on productivity increasing in bioanalysis. *Bioanalysis*, 6(12), 1691–1710. doi:10.4155/bio.14.118
- [34] Nováková, L., & Vlčková, H. (2009). A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*, 656(1-2), 8–35. doi:10.1016/j.aca.2009.10.004
- [35] Wenkui L., Wenying J., Yunlin F. (eds.) (2019) *Sample Preparation in LC-MS Bioanalysis*. John Wiley & Sons, Inc.
- [36] Alshammari T. M., Al-Hassan A. A., Hadda T. B., Aljofan M. (2015). Comparison of different serum sample extraction methods and their suitability for mass spectrometry analysis. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(6), 689–697. doi:10.1016/j.jsps.2015.01.023
- [37] Chen Y.-Y., Lin S.-Y., Yeh Y.-Y., Hsiao H.-H., Wu C.-Y., Chen S.-T., Wang A. H.-J. (2005). A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *ELECTROPHORESIS*, 26(11), 2117–2127. doi:10.1002/elps.200410381
- [38] Breda M., Basileo G., James C. A. (2003). Simultaneous determination of JTT-501 and its main metabolite in human plasma by liquid chromatography–ionspray mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 794(1), 167–174. doi:10.1016/s1570-0232(03)00453-7
- [39] Dams R., Huestis M. A., Lamber W. E., & Murphy, C. M. (2003). Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS: Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 14(11), 1290–1294. doi:10.1016/s1044-0305(03)00574-9.
- [40] Kocan G, Quang C, Tang D. Evaluation of protein precipitation filter plates for high-throughput LC-MS/MS bioanalytical sample preparation. *Am Drug Discovery* 2006;1(3):21–24
- [41] Walter R. E., Cramer J. A., Tse F. L. (2001). Comparison of manual protein precipitation (PPT) versus a new small volume PPT 96-well filter plate to decrease sample preparation time. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25(2), 331–337. doi:10.1016/s0731-7085(00)00464-7
- [42] Ma J., Shi J., Le H., Cho R., Huang J. C., Miao S., Wong B. K. (2008). A fully automated plasma protein precipitation sample preparation method for LC–MS/MS bioanalysis. *Journal of Chromatography B*, 862(1-2), 219–226. doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.012
- [43] Watt, A. P., Morrison, D., Locker, K. L., & Evans, D. C. (2000). Higher Throughput Bioanalysis by Automation of a Protein Precipitation Assay Using a 96-Well Format with Detection by LC–MS/MS. *Analytical Chemistry*, 72(5), 979–984. doi:10.1021/ac9906633
- [44] Palandra J., Weller D., Hudson G., Li J., Osgood S., Hudson, E., Cohen L. H. (2007). Flexible Automated Approach for Quantitative Liquid Handling of Complex Biological Samples. *Analytical Chemistry*, 79(21), 8010–8015. doi:10.1021/ac070618s.
- [45] Biddlecombe R. A., Pleasance S. (1999). Automated protein precipitation by filtration in the 96-well format. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 734(2), 257–265. doi:10.1016/s0378-4347(99)00355-2

- [46] Zolotov, Y. A., Kuz'min, N. M., Petrukhin, O. M., & Spivakov, B. Y. (1986). Liquid-liquid extraction in inorganic analysis: current status and prospects. *Analytica Chimica Acta*, 180, 137–161. doi:10.1016/0003-2670(86)80005-8
- [47] Clement R. E., Hao C. (2012). Liquid–Liquid Extraction. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 51–63. doi:10.1016/b978-0-12-381373-2.00063-6
- [48] Hoofnagle A. N., Laha T. J., Donaldson T. F. (2010). A rubber transfer gasket to improve the throughput of liquid–liquid extraction in 96-well plates: Application to vitamin D testing. *Journal of Chromatography B*, 878(19), 1639–1642. doi:10.1016/j.jchromb.2010.04.010
- [49] Zhang N., Hoffman K. L., Li W., Rossi D. T. (2000). Semi-automated 96-well liquid–liquid extraction for quantitation of drugs in biological fluids. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 22(1), 131–138. doi:10.1016/s0731-7085(99)00247-2
- [50] Jemal M., Teitz D., Ouyang Z., Khan S. (1999). Comparison of plasma sample purification by manual liquid–liquid extraction, automated 96-well liquid–liquid extraction and automated 96-well solid-phase extraction for analysis by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 732(2), 501–508. doi:10.1016/s0378-4347(99)00323-0
- [51] Shen Z., Wang S., & Bakhtiar R. (2002). Enantiomeric separation and quantification of fluoxetine (Prozac®) in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry using liquid-liquid extraction in 96-well plate format. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(5), 332–338. doi:10.1002/rcm.580
- [52] Zuloaga O., Olivares M., Navarro P., Vallejo A., Prieto, A. (2015). Dispersive liquid–liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. *Bioanalysis*, 7(17), 2211–2225. doi:10.4155/bio.15.141
- [53] Spietelun A., Marcinkowski Ł., de la Guardia M., Namieśnik J. (2014). Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta*, 119, 34–45. doi:10.1016/j.talanta.2013.10.050
- [54] Dugheri S., Mucci N., Bonari A., Marrubini G., Cappelli G., Ubiali D., Arcangeli, G. (2019). Liquid phase microextraction techniques combined with chromatography analysis: A review. *Acta Chromatographica*, 1–11. doi:10.1556/1326.2019.00636
- [55] Jeannot M. A., Przyjazny A., Kokosa J. M. (2010). Single drop microextraction—Development, applications and future trends. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2326–2336. doi:10.1016/j.chroma.2009.10.089
- [56] Ghambarian M., Yamini Y., Esrafil A. (2012). Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Microchimica Acta*, 177(3-4), 271–294. doi:10.1007/s00604-012-0773-x
- [57] Zgoła-Grześkowiak A., Grześkowiak T. (2011). Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(9), 1382–1399. doi:10.1016/j.trac.2011.04.014
- [58] Mallet, A. I. (1998). Solid-phase extraction: principles and practice E. M THURMAN and M. S MILLS: vol 147 in series chemical analysis, ed. J. D. Winefordner, John Wiley and Sons, New York, 1998

- [59] Poole, C. F. (2000). EXTRACTION | Solid-Phase Extraction. *Encyclopedia of Separation Science*, 1405–1416. doi:10.1016/b0-12-226770-2/02141-4
- [60] Abd-Talib N., Mohd-Setapar S. H., Khamis A. K. (2014). The Benefits and Limitations of Methods Development in Solid Phase Extraction: Mini Review. *Jurnal Teknologi*, 69(4). doi:10.11113/jt.v69.3177
- [61] Thermo Scientific Dionex AutoTrace 280 product brochure <http://www.dionex.com/en-us/products/sample-preparation/spe/instruments/lp-72869.html>
- [62] Pan J., Zhang C., Zhang Z., Li G. (2014). Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 815, 1–15. doi:10.1016/j.aca.2014.01.017
- [63] Płotka-Wasyłka J., Szczepańska N., de la Guardia M., & Namieśnik J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19–38. doi:10.1016/j.trac.2015.04.026
- [64] Vuckovic D. (2013). High-throughput solid-phase microextraction in multi-well-plate format. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 45, 136–153. doi:10.1016/j.trac.2013.01.004
- [65] Pawliszyn J. (2001). Chapter 1, Solid-phase microextraction in perspective, in: J. Pawliszyn (Editor), *Handbook of Solid-Phase Microextraction*, Chemical Industry Press, Beijing, China, pp. 1–12
- [66] Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., & Lanças, F. M. (2018). Current status and future trends on automated multidimensional separation techniques employing sorbent-based extraction columns. *Journal of Separation Science*. doi:10.1002/jssc.201800824
- [67] Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 86(2), 412–431. doi:10.1093/jaoac/86.2.412
- [68] Nguyen, T. D., Yu, J. E., Lee, D. M., & Lee, G.-H. (2008). A multiresidue method for the determination of 107 pesticides in cabbage and radish using QuEChERS sample preparation method and gas chromatography mass spectrometry. *Food Chemistry*, 110(1), 207–213. doi:10.1016/j.foodchem.2008.01.036
- [69] Nocentini, M., Focardi, C., & Fortini, M. (2010). Single laboratory validation and uncertainty estimation of multiresidues method for determination of pesticides in vegetables and fruits by using QuEChERS sample extraction and GC–MS. *Toxicology Letters*, 196, S325. doi:10.1016/j.toxlet.2010.03.1026
- [70] Koesukwiwat, U., Lehotay, S. J., & Leepipatpiboon, N. (2011). Fast, low-pressure gas chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry for analysis of 150 pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1218(39), 7039–7050. doi:10.1016/j.chroma.2011.07.094
- [71] Furlani, R. P. Z., Marcilio, K. M., Leme, F. M., & Tfouni, S. A. V. (2011). Analysis of pesticide residues in sugarcane juice using QuEChERS sample preparation and gas chromatography with electron capture detection. *Food Chemistry*, 126(3), 1283–1287. doi:10.1016/j.foodchem.2010.11.074

- [72] Lehotay, S. J., Mastovska, K., Lightfield, A. R., & Gates, R. A. (2010). Multi-Analyst, Multi-Matrix Performance of the QuEChERS Approach for Pesticide Residues in Foods and Feeds Using HPLC/MS/MS Analysis with Different Calibration Techniques. *Journal of AOAC*
- [73] Lesueur, C., Knittl, P., Gartner, M., Mentler, A., & Fuerhacker, M. (2008). Analysis of 140 pesticides from conventional farming foodstuff samples after extraction with the modified QuEChERS method. *Food Control*, 19(9), 906–914. doi:10.1016/j.foodcont.2007.09.002
- [74] Hou, X., Han, M., Dai, X., Yang, X., & Yi, S. (2013). A multi-residue method for the determination of 124 pesticides in rice by modified QuEChERS extraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1198–1205. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.089
- [75] Marchis, D., Ferro, G. L., Brizio, P., Squadrone, S., & Abete, M. C. (2012). Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. *Food Control*, 25(1), 270–273. doi:10.1016/j.foodcont.2011.10.055
- [76] Miao, Q., Kong, W., Yang, S., & Yang, M. (2013). Rapid analysis of multi-pesticide residues in lotus seeds by a modified QuEChERS-based extraction and GC–ECD. *Chemosphere*, 91(7), 955–962. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.104
- [77] Raynie D. E. (2016). Supporting Bioanalysis with Dried Blood Spots. *LCGC North America*. 34, 834–836
- [78] Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Hirtz C. (2013). Current and future use of “dried blood spot” analyses in clinical chemistry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 51(10). doi:10.1515/cclm-2013-0228
- [79] Gupta K., Mahajan R. (2018). Applications and diagnostic potential of dried blood spots. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*. 8, 1-2. <http://www.ijabmr.org/text.asp?2018/8/1/1/225448>
- [80] Grüner N., Stambouli O., Ross R. S. (2015). Dried blood spots – Preparing and processing for use in immunoassays and in molecular techniques. *Journal of Visualized Experiments*. 97:e52619, 1-9. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4397000/pdf/jove-97-52619.pdf>.
- [81] Chambers A. G., Percy A. J., Hardi D. B., Borchers C. H. (2013). Comparison of Proteins in Whole Blood and Dried Blood Spot Samples by LC/MS/MS. *Journal of The American Society for Mass Spectrometry*, 24(9), 1338–1345. doi:10.1007/s13361-013-0678-x
- [82] Meesters R., Hooff G., van Huizen N., Gruters R., & Luider, T. (2011). Impact of internal standard addition on dried blood spot analysis in bioanalytical method development. *Bioanalysis*, 3(20), 2357–2364. doi:10.4155/bio.11.202
- [83] Oellig C., Schwack W. (2011). Planar solid phase extraction—A new clean-up concept in multi-residue analysis of pesticides by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(37), 6540–6547. doi:10.1016/j.chroma.2011.06.108
- [84] Oellig C., Schwack W. (2012). Planar solid phase extraction clean-up for pesticide residue analysis in tea by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1260, 42–53. doi:10.1016/j.chroma.2012.08.088
- [85] Oellig C., Schwack W. (2014). Planar solid phase extraction clean-up and microliter-flow injection analysis–time-of-flight mass spectrometry for multi-residue screening of pesticides in food. *Journal of Chromatography A*, 1351, 1–11. doi:10.1016/j.chroma.2014.05.032

- [86] Perry J. A., Jupille T. H., Glunz L. J. (1975). TLC [thin-layer chromatography]. Programmed multiple development. *Analytical Chemistry*, 47(1), 65A–74a. doi:10.1021/ac60351a049
- [87] Sajewicz M., Kaczmarski K., Gontarska M., Kiszka S., & Kowalska, T. (2007). The Influence of Mobile Phase Demixion on Thin-Layer Chromatographic Enantioseparation of Ibuprofen and Naproxen. *Journal of Chromatographic Science*, 45(8), 500–506. doi:10.1093/chromsci/45.8.500
- [88] Grinberg N. (Editor)(1990) *Modern Thin Layer Chromatography*. Marcel Dekker. New York, USA.
- [89] Rolli, R.; Loppacher, M.; Morlock, G. The New TLC-MS Interface. *CAMAG Bibliogr. Service CBS* 2009,102, 2–3.
- [90] Sherma J., Fried B. (Editors) (2003) *Handbook of Thin-Layer. Chromatography*. Marcel Dekker. New York, U.S.A
- [91] Strain H. H., Sherma J., Benton F. L., Katz J. J. (1965). Radial paper chromatography and columnar chromatography of the chloroplast pigments of leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biophysics Including Photosynthesis*, 109(1), 23–32. doi:10.1016/0926-6585(65)90086-5
- [92] Zapala, W. (2003). Influence of Mobile Phase Composition on Retention Factors in Different HPLC Systems with Chemically Bonded Stationary Phases. *Journal of Chromatographic Science*, 41(6), 289–294. doi:10.1093/chromsci/41.6.289
- [93] Flieger, J. (2007). Effect of mobile phase composition on the retention of selected alkaloids in reversed-phase liquid chromatography with chaotropic salts. *Journal of Chromatography A*, 1175(2), 207–216. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.036
- [94] Jandera, P., & Hájek, T. (2017). Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review. *Journal of Separation Science*, 41(1), 145–162. doi:10.1002/jssc.201701010
- [95] Cooper, W. T., & Lin, L.-Y. (1986). Effects of stationary-phase polarity on retention in reversed bonded phase HPLC columns. *Chromatographia*, 21(6), 335–341. doi:10.1007/bf02311606
- [96] Limsavarn, L., & Dorsey, J. G. (2006). Influence of stationary phase solvation on shape selectivity and retention in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1102(1-2), 143–153. doi:10.1016/j.chroma.2005.10.035
- [97] Heinisch, S., & Rocca, J. L. (2004). Effect of mobile phase composition, pH and buffer type on the retention of ionizable compounds in reversed-phase liquid chromatography: application to method development. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 183–193. doi:10.1016/j.chroma.2004.07.022
- [98] Wiczling, P., Kubik, Ł., & Kaliszan, R. (2015). pH Effects on Chromatographic Retention Modes. *Analytical Separation Science*, 263–278. doi:10.1002/9783527678129.assep013
- [99] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb1476086.htm

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

- opieka nad Stażystą z Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (adiunkt z Katedry Analizy i Oceny Żywności Wydziału Nauk o Żywności i Technologii), odbywającego staż naukowy o charakterze szkoleniowym w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, którego celem jest zapoznanie Stażysty z nową techniką przygotowania próbek do analizy instrumentalnej oraz próba wykorzystania poznanej techniki do oznaczania witaminy C w próbkach żywności - umowa nr VKA/2D/1/2019
- współpraca z prof. Heinzem Engelhardtem z Uniwersytetu w Saarland w Niemczech (efektem współpracy jest publikacja: Zał. 4, II.4 poz.2)
- współpraca z Wojewódzkim Szpitalem Specjalistycznym im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego w Lublinie (efektem współpracy jest publikacja: Zał. 4, II.4 poz.15) – umowa zawarta 27.03.2017 r.
- współpraca z Samodzielnym Publicznym Szpitalem Klinicznym Nr 4 w Lublinie (efektem współpracy jest publikacja: Zał. 4, II.4 poz.24) – umowa zawarta 28.06.2016 r.
- współpraca z Uniwersytetem Marii Curie Skłodowskiej w Lublinie (efektem współpracy są publikacje: Zał. 4, II.4 poz. 14 i 19)
- współpraca z Przedsiębiorstwem Handlowym "Krautex", Kolonia Łopiennik Dolny 1 – umowa zawarta 28.06.2016 r.
- współpraca z Laboratorium Przemysłu Paszowego w Lublinie (efektem współpracy jest publikacja: Zał. 4, II.4 poz.20)
- współpraca z Katedrą Chemii Środowiska i Bioanalizy Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu (efektem współpracy są publikacje: Zał. 4, II.4 poz. 1 i 22)
- współpraca z Urzędem Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (efektem współpracy jest publikacja: Zał. 4, II.4 poz. 26)

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

zajęcia dydaktyczne

- Prowadzenie ćwiczeń z chemii fizycznej dla studentów Farmacji od 2006 r.
- Prowadzenie wykładów oraz ćwiczeń z chemii fizycznej dla studentów Analityki Medycznej od 2012.
- Prowadzenie wykładów i ćwiczeń z chemii fizycznej dla studentów Kosmetologii w roku 2014.
- Prowadzenie wykładów i ćwiczeń w języku angielskim dla studentów Wydziału Lekarskiego z Oddziałem Anglojęzycznym z przedmiotu General and Analytical Chemistry (od 2012 r.).
- Prowadzenie seminariów dla studentów Farmacji (od 2006 r. – obecnie) oraz Analityki Medycznej (w 2018 r.).

kursy i warsztaty

- Członek zespołu prowadzącego kursy wysokosprawnej chromatografii cieczowej w latach 2006 – 2010.
- Współprowadzenie warsztatów pt. Technika HPLC, możliwości chromatografii cieczowej, w ramach IV Ogólnopolskiej Konferencji Lubelskiego Towarzystwa Studentów Analityki Medycznej (2016).
- Wykład na konferencji studenckiej: Conference BE in Progress 3, “Sample preparation in instrumental analysis” 12-15.04.2018r.

promotorstwo prac

- Byłam promotorem 13 doświadczalnych prac magisterskich wykonywanych przez studentów kierunku Farmacja, Analityka Medyczna oraz Kosmetologia w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii UM w Lublinie.
- Promotorstwo pomocnicze w pracy doktorskiej Beaty Misiołek pt. ”Wpływ modyfikatora fazy ruchomej na selektywność rozdzielania substancji w wysokosprawnej chromatografii cieczowej z układem faz odwróconych i różnymi adsorbentami” promotor: prof. dr hab. Tadeusz H. Dzido.
Przewód doktorski zakończony obroną w dniu 09/10/2014.

- Promotorstwo pomocnicze w pracy doktorskiej Kamili Jaglińskiej pt. "Badania nad przygotowaniem próbek leków hipotensyjnych z matryca biologiczna do analizy instrumentalnej z wykorzystaniem ekstrakcji z pozycji frontu rozpuszczalnika w warstwie adsorbentu"

promotor: dr hab. Beata Polak.

Przewód doktorski w toku.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

I. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Swoją pracę naukową rozpoczęłam w Zakładzie Chemii Fizycznej Katedry Chemii w 2006 roku. Prowadziłam badania w zespole dr hab. Tadeusza Dzido, gdzie zajmowałam się zagadnieniem wpływu modyfikatora fazy ruchomej na selektywność rozdzielania substancji w odwróconym układzie faz chromatografii cieczowej wysokosprawnej. Badania te były kontynuacją podejścia zaproponowanego przez prof. dr hab. Tadeusza Dzido, które to podejście dotyczy wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania substancji, wywołane zmianą modyfikatora eluentu, z uwzględnieniem oddziaływań cząsteczkowych substancji ze składnikami niepolarniej fazy stacjonarnej, a z pominięciem oddziaływań substancji w fazie ruchomej. Moje badania miały na celu sprawdzenie czy podejście to może być zastosowane do wyjaśniania zmian selektywności różnych grup substancji, w tym także ulegających dysocjacji. Wyniki uzyskane podczas eksperymentów oraz ich interpretacje przedstawiłam w publikacji [Zał. 4, II.4 poz. 1], która poświęcona była zmianom selektywności rozdzielania substancji należących do trzech grup chemicznych: aromatycznych węglowodorów, barbituranów oraz kwasów fenolowych w układach z metanolem, acetonitrylem i tetrahydrofuranem oraz fazą stacjonarną typu C18.

Oprócz mojego głównego nurtu zainteresowań, brałam również udział w badaniach nad rozwojem elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej (PPEC). PPEC była wówczas nowatorską techniką, rozwijaną w Zakładzie Chemii Fizycznej, charakteryzującą się wyższą efektywnością rozdzielania składników mieszanin substancji, skróceniem czasu rozdzielania

oraz odmienną selektywnością w porównaniu do chromatografii planarnej, Rezultatem tych badań było powstanie publikacji przedstawiającej możliwość zastosowania układów PPEC do wyznaczania zależności retencja - skład w układach chromatograficznych [Zał. 4, II.4 poz. 2].

Łączny współczynnik wpływu (Impact Factor) moich prac opublikowanych przed uzyskaniem stopnia doktora nauk farmaceutycznych wyniósł 1,406. Do mojego dorobku powstałego w tym okresie zaliczam również 8 komunikatów zjazdowych, w tym dwóch wykładów, przedstawianych na konferencjach krajowych i międzynarodowych (Zał. 4, II.7 poz. 1 i 2).

Pracę doktorską, zatytułowaną „Wpływ modyfikatora eluentu na selektywność rozdzielania substancji z uwzględnieniem związków biologicznie aktywnych i odwróconych układów jonowo-asocjacyjnych wysokosprawnej chromatografii cieczowej”, obroniłam 27.05.2010 r. na macierzystym Wydziale. Jej promotorem był prof. dr hab. Tadeusz Dzido. Celem pracy było sprawdzenie czy możliwe jest wyjaśnianie zmian selektywności rozdzielania substancji w chromatografii cieczowej, gdy ma miejsce zmiana rodzaju modyfikatora w fazie ruchomej, przy zastosowaniu uproszczonego podejścia interpretacji tych zmian, polegającego na braniu pod uwagę tylko oddziaływań cząsteczkowych substancji rozdzielanych ze składnikami strefy powierzchniowej fazy stacjonarnej typu C-18 oraz z uwzględnieniem zróżnicowanego stopnia uporządkowania łańcuchów alkilowych, zależnie od rodzaju modyfikatora. Oddziaływania w fazie ruchomej zostały pominięte. Szczególnym przedmiotem mojego zainteresowania były układy jonowo - asocjacyjne. Porównywałam zmiany retencji i selektywności rozdzielania substancji z kilku grup chemicznych w układach z różnymi modyfikatorami (metanol, tetrahydrofuran, acetonitryl) lub/i dodatkiem odczynników jonowo-asocjacyjnych. Uzyskane przez mnie wyniki potwierdziły słuszność przyjętego sposobu interpretacji względnych zmian retencji.

Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych

Moja działalność naukowo-badawcza prowadzona po obronie pracy doktorskiej koncentrowała się na następujących zagadnieniach:

1. Opracowanie procedury przygotowania próbek biologicznych do oznaczania substancji biologicznie aktywnych metodami instrumentalnymi.
2. Badania wpływu modyfikatora eluentu na selektywność rozdzielania substancji z w układach z różnymi modyfikatorami

3. Elektrochromatografia planarna ciśnieniowa - możliwości techniki i jej wykorzystanie.

Wyniki uzyskane w ramach pracy nad zagadnieniem wpływu modyfikatora eluentu na selektywność rozdzielania substancji z w układach z różnymi modyfikatorami (kontynuacja badań podjętych w ramach pracy doktorskiej) opisałam w czterech pracach, w których przedstawiłam wpływ stosowanego eluentu na retencję i selektywność rozdzielania kwasów fenolowych [Zał. 4, II.4 poz. 4], węglowodorów alifatycznych [Zał. 4, II.4 poz. 6], węglowodorów aromatycznych [Zał. 4, II.4 poz. 7] oraz sprawdziłam czy przedstawione powyżej podejście wyjaśniania zmian selektywności rozdzielania substancji ma również zastosowanie do układów z innymi niepolarnymi adsorbentami, zawierającymi łańcuchy alkilowe o różnej długości [Zał. 4, II.4 poz. 26].

Wraz z członkami zespołu badawczego Zakładu Chemii Fizycznej prowadziłam badania nad elektrochromatografią planarną ciśnieniową. Efektem tej współpracy jest pięć artykułów. Pierwszy z nich dotyczy porównania sprawności układów technik PPEC, HPLC oraz TLC [Zał. 4, II.4 poz. 3]. W kolejnym, zastosowaliśmy elektrochromatografię planarną ciśnieniową (PPEC) i wysokosprawną chromatografię cienkowarstwową (HPTLC) do rozdzielania i oznaczenia składników tabletek Cefalgin (paracetamolu, propyfenazonu i kofeiny). Okazało się, że dzięki zastosowaniu techniki PPEC można znacznie (około 4 krotnie) skrócić czas analizy w porównaniu do techniki HPTLC, przy zachowaniu porównywalnej dokładności, precyzji, czułości, liniowości i specyficzności metody [Zał. 4, II.4 poz. 5].

We współpracy z dr. Adamem Chomickim [Zał. 4, II.4 poz. 11] prowadziłam badania mające na celu porównanie selektywności rozdzielania aminokwasów w układach chromatografii cienkowarstwowej oraz elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, z żelem krzemionkowym jako fazą stacjonarną. Wykazaliśmy, że w układach PPEC selektywność rozdzielania substancji jest zróżnicowana w porównaniu do układów TLC, dodatkowo zauważyliśmy większy wpływ pH na retencję aminokwasów w układzie elektrochromatografii planarnej ciśnieniowej, w porównaniu do układów TLC.

W kolejnym artykule, we współpracy z dr hab. Beatą Polak, przedstawiliśmy wyniki badań nad wpływem różnych parametrów (pH, stężenia organicznego modyfikatora, temperatury) na selektywność rozdzielania substancji biologicznie aktywnych (β - blokerów) w układach PPEC [Zał. 4, II.4 poz. 10]. Wykazaliśmy, że w przypadku zastosowania techniki TLC, że pH buforu eluentu w badanym zakresie (3,0 – 7,0) nieznacznie

wpływa na zmiany retencji FVDA (amidu 1-fluoro 2,4-dinitrofenylo-5-L waliny)-pochodnych. Natomiast, w przypadku zastosowania techniki PPEC, zmiana pH buforu fazy ruchomej znacząco modyfikuje migrację tych substancji. Ponadto ma miejsce znacznie większa selektywność rozdzielania i zmiany kolejności migracji poszczególnych związków w układach PPEC w porównaniu do układów TLC.

W kolejnym artykule z moim współautorstwem [Załącznik 4, II.4 poz. 15] zaprezentowaliśmy wyniki zastosowania techniki PPEC, w analizie toksykologicznej, do oznaczania substancji obecnych w próbkach biologicznych (wymiocinach). W oparciu o dane czasów retencji uzyskane w układach TLC, dystansów migracji w układach PPEC oraz maksimów absorpcji UV-VIS substancji dokonaliśmy identyfikacji związków. Dzięki temu, że selektywność rozdzielania w układach PPEC jest odmienna w porównaniu do tej zaobserwowanej w układach TLC, identyfikacja substancji w oparciu o trzy różne parametry była wiarygodna, co potwierdziłam analizą jakościową przy wykorzystaniu spektrometrii mas.

W ramach współpracy z Instytutem fizyki UMCS powstały trzy artykuły dotyczące zmian struktury polimeru (zerwanie licznych wiązań chemicznych, sieciowanie polimeru, tworzenie klastrów węgla o hybrydyzacji sp²) pod wpływem oddziaływania z jonami [Załącznik 4, II.4 poz. 14, 19 i 25]. Cienkie (3 μm) folie z politereftalanu etylenu napromieniowano jonami He⁺, Ne⁺ i Ar⁺ o energii 135 keV oraz jonami K⁺ o energii 150 keV. Zmiany struktury chemicznej polimeru badano stosując spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera oraz spektroskopię Ramana. Badano także wpływ promieniowania na zmianę własności elektrycznych folii, takich jak oporność jak i stała dielektryczna.

Efektom współpracy z prof. Tadeuszem. Dzido, dr. Radosławem Gwardą oraz zespołem prof. Matosiuka (Zakład Technologii i Postaci Leku, Uniwersytetu Medycznego w Lublinie) były dwie prace. Jedną z nich dotyczyła wpływu składników fazy ruchomej na retencję i selektywność rozdzielania wybranych peptydów w układach HPTLC z adsorbentami typu C18 [Załącznik 4, II.4 poz. 9]. Wykazano w niej, że dodatek odczynnika jonowo - asocjacyjnego do fazy ruchomej ma odmienny wpływ na retencję substancji w układach TLC w porównaniu do układów HPLC. Płytki z żelazem krzemionkowym modyfikowanym grupami C18 zapewniają bardziej złożone mechanizmy retencji, oparte o różne oddziaływania, zarówno niepolarne jak i polarne (wynikające z zawartości znacznej liczby wolnych grup silanolowych), a zatem należy je raczej traktować jako adsorbenty mieszane niż klasyczne adsorbenty niepolarne typu C18. Z tego powodu nie można bezpośrednio zaadaptować warunków separacji (tj. składu

fazy ruchomej) układu RP-HPTLC do prowadzenia procesu rozdzielania techniką RP-HPLC. Podczas przeprowadzania eksperymentów do wspomnianej pracy zauważono zniekształcanie stref/pików substancji (peptydów), szczególnie gdy stosowana faza ruchoma zawierała odczynniki jonowo – asocjacyjne. Próba wyjaśnienia tego zagadnienia została przedstawiona w kolejnym artykule [Zał. 4, II.4 poz. 17], gdzie udowodniono, że zanieczyszczenia metaliczne, obecne w adsorbencie płytek chromatograficznych, silnie wpływają na aktywność wolnych grup silanolowych, a w konsekwencji, powodują zatrzymywanie związków o charakterze zasadowym lub amfoterycznych, co pogarsza jakość uzyskanych wyników. Zaobserwowano również, że przemywanie płytek chromatograficznych metanolem nie eliminuje wszystkich zanieczyszczeń warstwy adsorbentu. Natomiast zastosowanie roztworów z dodatkiem kwasów, znacznie zmniejsza ilość zanieczyszczeń metalicznych w warstwie adsorbentu, ale jednocześnie prowadzi do wzrostu zróżnicowania aktywności grup kwasowych i pogorszenia sprawności układu separacyjnego.

Efektom mojej współpracy z dr Anetą Hałką-Grysińską były dwa artykuły dotyczące rozwijania gradientowego chromatogramów z wykorzystaniem prototypowego urządzenia do chromatografii planarnej, zbudowanego w Zakładzie Chemii Fizycznej [Zał. 4, II.4 poz. 12 i 18]. Urządzenie to umożliwia zastosowanie nowego podejścia do rozwijania chromatogramów cienkowarstwowych podczas elucji gradientowej. Zastosowanie kontrolowanego przepływu eluentu, automatyzacja procesu rozwijania chromatogramu, brak opóźnienia gradientu (dzięki mieszaniu się składników eluentu na warstwie adsorbentu) pozwalają na osiągnięcie wyższej sprawności, rozdzielczości, pojemności pikowej układu chromatograficznego. Umożliwia także wykonanie elucji gradientowej skokowej i ciągłej. Takie rozwiązanie nie było dotąd znane w literaturze światowej.

Mój dorobek naukowy (bez publikacji wchodzących do cyklu habilitacyjnego) po uzyskaniu stopnia doktora obejmuje: 18 pełnotekstowych prac oryginalnych i 1 pracę przeglądową. Łączny współczynnik oddziaływania, IF, tych publikacji wynosi 31,259 (KBN/MNiSW = 555). Wyniki badań zaprezentowałam w formie 32 doniesień zjazdowych na konferencjach krajowych i międzynarodowych, podczas których byłam współautorem wykładów plenarnych i wystąpień ustnych na konferencjach krajowych i międzynarodowych [Zał. 4, II.7].

II. Nagrody za działalność naukową albo artystyczną

- Zespołowa Nagroda Naukowa Ministra Zdrowia 2009
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego indywidualna III stopnia 2010
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego indywidualna III stopnia 2016
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego indywidualna III stopnia 2017
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego indywidualna III stopnia 2018
- Nagroda Rektora Uniwersytetu Medycznego indywidualna III stopnia 2019

III. Ukończone szkolenia specjalistyczne i warsztaty

- Szkolenie z zakresu obsługi elektroforezy kapilarnej CE model Agilent 7100. Lublin, 16.05.2012 r.
- Szkolenie z zakresu obsługi spektrometru mas Triple Quadrupole model Agilent 6460. Lublin, 30.05.2012 r.
- Seminarium Perlan Technologies z zakresu tematów LCMS i GCMS. Warszawa, 26-27.09.2012 r.
- Szkolenie z zakresu obsługi chromatografu cieczowego model Agilent 1290 Infinity. Lublin, 11.10.2012 r.
- Szkolenie z zakresu obsługi detektora mas TOF model Agilent 6224 oraz źródła DART. Lublin, 18.12.2012 r.
- Szkolenie dla pracowników naukowo-dydaktycznych Wydziału Farmaceutycznego w zakresie interpretacji wyników otrzymanych innowacyjnymi (zaawansowanymi) technikami spektroskopowymi (UV, FTIR, MS, Raman, NMR) organizowane przez UMCS. Lublin, 08.02.2013 r.
- Szkolenie: „Techniki przygotowania próbek analitycznych” organizowane przez firmę Merck. Warszawa, 30.10.2014 r.
- Szkolenie z obsługi Spektrofotometru Genesys 20 vis. Lublin, 24.10.2014 r.
- Szkolenie Przygotowanie programów kształcenia oraz efektów kształcenia zgodnie z KRK i aktualnymi regulacjami prawnymi. Optima Centrum Rozwoju Kadr. Lublin, 8.06.2016 r.
- Seminarium chromatograficzne, Merck. Warszawa, 14.10.2016 r.
- Szkolenie „Pomiary własności elektrycznych polimerów modyfikowanych poprzez naświetlanie wiązkami jonowymi” prowadzone przez Instytut Fizyki UMCS. Lublin, 2016r.
- Webinarium “Oh no! Not another boring webinar on column lifetime?” Agilent Technologies. 30.05.2020 r.
- Szkolenie z zastosowania obsługi urządzenia do homogenizacji i ekstrakcji związków z materiału roślinnego i biologicznego -2010 Geno Grinder. Lublin, 6.03.2020 r.
- Webinarium „Optymalizacja systemu HPLC” organizowane przez firmę Phenomenex. 22.04.2020 r.

10.11.2020 Anna Klimek-Turek