

Autoreferat informujący o zainteresowaniach i osiągnięciach w działalności naukowo – badawczej ze szczególnym wyróżnieniem osiągnięcia określonego w Art. 16 ust. 2 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki w języku polskim



WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Małgorzata Starek

Opracowanie metod separacyjnych i spektroskopowych do analizy wybranych
leków o działaniu przeciwzapalnym

KRAKÓW 2015

SPIS TREŚCI

1. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe	3
2. Informacje o zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
3. Osiągnięcie stanowiące podstawę habilitacji wynikające z Art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)	3
3.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji	4
3.2. Omówienie celu naukowego oraz osiągniętych wyników	5
3.3. Prezentacja wyników badań	6
3.3.1. Warunki identyfikacji i analiza ilościowa oksykamów i koksylów w materiale o zróżnicowanej matrycy	9
3.3.2. Walidacja opracowanych metod	14
3.3.3. Ocena kinetyczna i termodynamiczna trwałości wybranych substancji	16
3.3.4. Analiza właściwości lipofilo-hydrofilowych badanych związków	21
3.4. Podsumowanie wyników badań	24
4. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	26
4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	27
4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	29
4.3. Inne formy działalności naukowo-badawczej	32
5. Działalność dydaktyczna i organizacyjna	33

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- 1993 dyplom i tytuł magistra chemii uzyskany na podstawie pracy magisterskiej pt. "Opracowanie zestawu folio i fazogramów wraz z przewodnikiem metodycznym do nauczania wybranych zagadnień z chemii organicznej. Część I" na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- 2003 dyplom i stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności chemia analityczna uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Densytometryczna ocena jakości wybranych leków przeciwbólowych” na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
- 2012 dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie „Biologia Molekularna” prowadzonych na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

2. INFORMACJE O ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

Od 01.10.1993 roku - pracownik Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Zajmowane stanowiska:

01.10.1993 – 31.08.2003 – asystent

01.09.2003 – 28.02.2013 – adiunkt

01.03.2013 do chwili obecnej – starszy wykładowca

3. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI wynikające z Art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)

Przedstawiony do oceny w postępowaniu habilitacyjnym monotematyczny cykl publikacji składający się z opublikowanych oryginalnych prac naukowych dotyczy **Opracowania metod separacyjnych i spektroskopowych do analizy wybranych leków o działaniu przeciwzapalnym.**

Prezentowane osiągnięcie naukowe stanowi cykl badań składający się z głównych wątków badawczych obejmujących:

1. Identyfikację i oznaczanie substancji metodą chromatografii cienkowarstwowej
2. Walidację opracowanych metod analitycznych
3. Oznaczanie zawartości substancji leczniczej w materiale o zróżnicowanej matrycy
4. Badania trwałości substancji leczniczej
5. Analizę parametrów retencji w kontekście przewidywanej aktywności biologicznej związków.

3.1. Wykaz publikacji stanowiących podstawę habilitacji

Podstawę pracy habilitacyjnej stanowi cykl jedenastu opublikowanych prac o sumarycznym IF (*Impact Factor* wg Journal Citation Reports ICR) wynoszącym 17,233 (MNiSW 29 pkt). We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem.

H1. Starek M., Krzek J., A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone, *Talanta*, 77, 925-942, 2009

IF₂₀₀₉ = 3.290 MNiSW 24 pkt

H2. Starek M., Krzek J., Tarsa M., Żylewski M., Determination of piroxicam and degradation products in drugs by TLC, *Chromatographia*, 69, 351-356, 2009

IF₂₀₀₉ = 1.908 MNiSW 15 pkt

H3. Starek M., Review of the applications of different analytical techniques for coxibs research, *Talanta* 85, 8-27, 2011

IF₂₀₁₁ = 3.794 MNiSW 40 pkt

H4. Starek M., Krzek J., Dechnik J., Separation and determination of rofecoxib and its degradation products by TLC chromatography, *Journal of Analytical Chemistry*, 6, 623-631, 2009

IF₂₀₀₉ = 0.604 MNiSW 10 pkt

H5. Starek M., Krzek J., Tarsa M., TLC-densitometric determination of tenoxicam beside its degradation products in pharmaceutical preparations and after hydrolysis in solutions, *JPC—Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 24, 337-343, 2011

IF₂₀₁₁ = 0.767 MNiSW 20 pkt

H6. Starek M., Krzek J., Determination of meloxicam in pharmaceutical preparations and after acidic and alkaline hydrolysis by thin-layer chromatography, *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 69, 225-235, 2012

IF₂₀₁₂ = 0.665 MNiSW 15 pkt

H7. Starek M., Krzek J., Quantitation of isoxicam in presence of related compounds by TLC-densitometry, *Acta Chimica Slovenica*, 59, 315-321, 2012

IF₂₀₁₂ = 1.135 MNiSW 25 pkt

H8. Starek M., Rejdych M., Densitometric analysis of celecoxib, etoricoxib and valdecoxib in pharmaceutical preparations, JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC, 22, 399-403, 2009
IF₂₀₀₉ = 0.662 MNiSW 15 pkt

H9. Starek M., Separation and determination of four oxicams in pharmaceutical formulations by thin-layer chromatographic – densitometric method, JPC–Journal of Planar Chromatography–Modern TLC, 5, 367-372, 2011
IF₂₀₁₁ = 0.767 MNiSW 20 pkt

H10. Starek M., Krzek J., Rotkegel P., TLC determination of piroxicam, tenoxicam, celecoxib and rofecoxib in biological material, Journal of Analytical Chemistry, 70, 351-359, 2015
IF₂₀₁₃ = 0.812 MNiSW 15 pkt

H11. Starek M., Komsta Ł., Krzek J., Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 85, 132-137, 2013
IF₂₀₁₃ = 2.829 MNiSW 30 pkt

Wymienione artykuły załączone zostały w **Załączniku 4** i cytowane są w tekście z literą 'H' przed numerem odnośnika (np.[H1]).

Badania ¹H NMR [H2, H4] prowadzone były we współpracy z Pracownią Spektroskopii Magnetycznego Rezonansu Jądrowego Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Badania LC-MS/MS [H2, H5, H6, H7] wykonano w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego dołączono oświadczenia współautorów pracy określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie (**Załącznik 5**).

3.2. Omówienie celu naukowego oraz osiągniętych wyników

Głównym celem prowadzonych badań było opracowanie nowych procedur analitycznych do separacji, oznaczania jakościowego i ilościowego substancji chemicznych należących do grup oksykamów i koksylów. Opracowane warunki wykorzystano do oznaczeń zawartości składników badanych w różnych matrycach, badania czystości i trwałości substancji. Prace ukierunkowano na poszukiwanie metody analitycznej spełniającej kryteria specyficzności, precyzji i dokładności oznaczeń, które warunkują przydatność w analizie leków. Ważnym założeniem było, by opracowane metody umożliwiały identyfikację i oznaczanie ilościowe związków posiadających podobną strukturę chemiczną i podobne właściwości fizykochemiczne. Skoncentrowano się na opracowaniu nowych, jak najbardziej optymalnych warunków analizy, które pozwolą na uzyskanie dobrej retencji,

sprawności układów chromatograficznych, kształtu uzyskiwanych pików oraz selektywności rozdzielania. Wykorzystano i zbadano przydatność zoptymalizowanych układów w analizie leków oraz materiału biologicznego. W dalszym etapie badań przeanalizowano różne warunki chromatograficzne przydatne do wyznaczenia parametrów lipofilowości wybranych związków.

W realizacji podjętych zamierzeń można wyróżnić następujące etapy:

- przeprowadzenie studium literaturowego dotyczącego zastosowań dostępnych metod analitycznych w badaniach oksykamów i koksylów, którego wynikiem są opracowania przeglądowe, obejmujące aplikacje różnorodnych technik analitycznych do badań wybranych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ),
- optymalizacja warunków rozdziału substancji czynnej obok ewentualnych zanieczyszczeń i sposobu jednoczesnej identyfikacji składników oraz warunków detekcji w aspekcie analizy ilościowej tych substancji z wykorzystaniem metody TLC w połączeniu z densytometrią,
- przeprowadzenie walidacji opracowanych metod i ustalenie procedury wykonania oznaczeń w preparatach farmaceutycznych,
- zbadanie wpływu środowiska (pH, temperatura, czas inkubacji) na trwałość badanych substancji w roztworach, określenie struktury powstających produktów i ewentualnego mechanizmu zachodzących reakcji,
- ustalenie warunków jednoczesnego oznaczania wybranych leków obok siebie, co może stanowić podstawę rutynowej analizy przesiewowej dla danej grupy leków,
- opracowanie warunków identyfikacji i oznaczania wybranych leków w materiale biologicznym,
- określenie parametrów kinetycznych (stałe szybkości reakcji, $t_{0,5}$ i $t_{0,1}$), termodynamicznych (energia aktywacji) i fizykochemicznych (logP) dla badanych związków.

3.3. Prezentacja wyników badań

Do oceny podstawowych kryteriów jakości i trwałości substancji wykorzystywana jest bardzo zróżnicowana metodyka badań, obejmująca metody klasycznej analizy chemicznej oraz metody instrumentalne. Wybór techniki analitycznej jest bardzo istotny z uwagi na różne parametry związane z budową chemiczną, właściwościami fizykochemicznymi substancji, charakterem zachodzącej przemiany chemicznej, stężeniem leku i powstającego produktu, a także zmiennością matrycy analizowanej próbki. Stosowane metody muszą więc być odpowiednie dla każdego z tych parametrów oraz muszą gwarantować wysoką jakość otrzymywanych wyników, zgodną z wartością prawidłową. Znajomość podstaw molekularnych rozdzielania chromatograficznego, wraz z wykorzystaniem modeli matematycznych w aspekcie modyfikacji retencji i selektywności, może stanowić o wypracowaniu odpowiedniej strategii optymalizacyjnej. Poza szeroko stosowaną

chromatografią cieczową (HPLC) w praktyce laboratoryjnej wciąż znajduje zastosowanie metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC) [1]. Ciągła optymalizacja i automatyzacja warunków (aplikatory, komory, detektory) powoduje, że jest ona stosowana jako metoda szybka, „elastyczna” oraz łatwo dostępna do zastosowania zarówno w analizie jakościowej jak i ilościowej szeregu substancji.

Wśród zalet decydujących o wyborze metody rozdzielczej można wymienić przede wszystkim: brak konieczności bardzo dokładnego oczyszczania próbek; sposób rozdziału w znaczący sposób eliminujący efekty matrycowe; możliwość przeprowadzenia wielu analiz równocześnie, na jednej płytce, co wiąże się z zużyciem mniejszej ilości odczynników i znacznie skraca czas wykonania analizy w porównaniu z innymi metodami analitycznymi. Dzięki możliwości rejestracji chromatogramów wielokrotnie można powtórzyć tę samą analizę przy różnych długościach fali, stosując różne metody identyfikacji substancji na płytce (absorpcja, fluorescencja, związki barwne lub dające barwne pochodne). Ciągłe ulepszanie aparatury pozwala na prowadzenie oznaczeń ilościowych na niskich poziomach stężeń składników bezpośrednio z chromatogramów, a także na rejestrację widm absorpcji lub fluorescencji bezpośrednio z płytki w zakresie 190-800 nm. Cechy te można wykorzystać do szybkiego i stosunkowo taniego sprawdzania kinetyki reakcji chemicznej i czystości produktu. Metody chromatograficzne służą nie tylko do rozdzielania mieszanin; stały się także narzędziem do badań nad mechanizmami wielu zjawisk. Na podstawie analizy wartości retencji, uzyskuje się szereg informacji dotyczących budowy związków, ich polarności, hydrofilowości, hydrofobowości, adsorpcji, itp. Zależności te pomagają w optymalizacji warunków chromatograficznych podczas rozwiązywania konkretnych problemów analitycznych np. badań lipofilowości [2, 3].

Liczna reprezentacja niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) obejmująca m.in. nioselektywne i selektywne inhibitory cyklooksygenaz, ze względu na swoje działanie przeciwzapalne, przeciwbólowe i przeciwgorączkowe oraz szeroką dostępność bez recepty jest stosowana w dużych ilościach przez chorych, także bez konsultacji z lekarzem. Leki te mają szerokie zastosowanie szczególnie w reumatologii [4], w leczeniu stanów zapalnych, bólów o różnej etiologii oraz zmian urazowych [5-8].

Przedmiotem badań opisanych w niniejszej pracy są związki chemiczne z grupy NLPZ, pochodne kwasów enolowych, oksykamy i koksyby (Rysunek 1).

1. Ł. Komsta, M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, *Thin layer chromatography in drug analysis*, seria Chromatographic Science Vol. 106, CRC Press, 2013

2. Z. Witkiewicz, *Podstawy chromatografii*, WNT, Warszawa, 1995

3. V. Pliška, B. Testa, H. Van de Waterbeemd, *Lipophilicity in Drug Action and Toxicology*, VCH, Weinheim, 1996

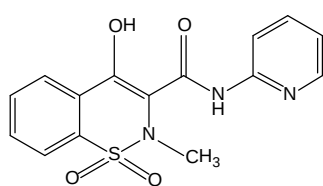
4. J. Szechiński, *Medycyna po Dyplomie*, wyd. luty, 4-14, 2000

5. B. Hinz, C.P. Dorn, T.Y. Shen, K. Brune, *Anti-inflammatory-antirheumatic drugs*, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Tom A3, Wiley-VCH, Weinheim, 2002

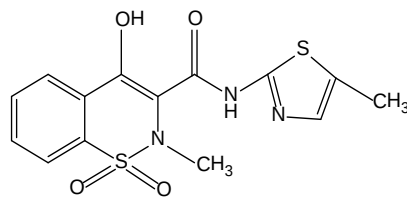
6. A. Danysz, *Kompendium farmakologii i farmakoterapii dla lekarzy, farmaceutów i studentów*, Urban&Partner, Wrocław, 2002

7. J.B. Felder, B.I. Korelitz, R. Rajapakse, S. Schwarz, A.P. Horatagis, G. Gleim, *Am. J. Gastroenterol.*, 95, 1859-1861, 2000

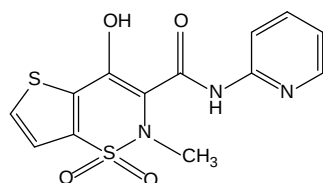
8. D.J. Bjorkman, *Rev. Gastroenterol. Disord.*, 1, 121-127, 2001



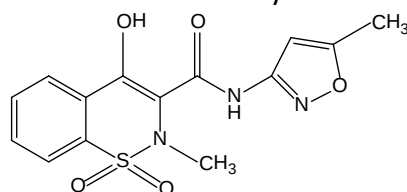
Piroksydam



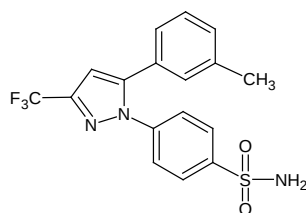
Meloksydam



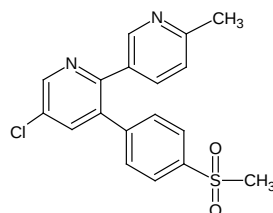
Tenoksydam



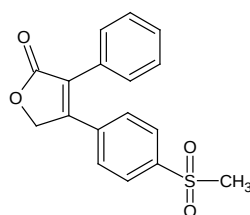
Izoksydam



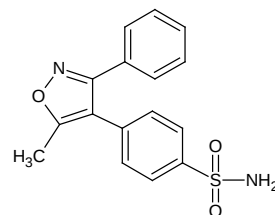
Celekoksyb



Etorykoksyb



Rofekoksyb



Waldekoksyb

Rysunek 1. Struktura analizowanych związków chemicznych.

Struktura oksydamów (meloksydam, piroksydam, tenoksydam, izoksydam) wywodzi się z układu heterocyklicznego benzo(tieno)tiazyny, w którym siarka tiazyny znajduje się w ugrupowaniu cyklicznego N-metylosulfonamidu, a w położeniu 4 występuje grupa enolowa. Skondensowanie pierścienia benzenowego lub tiofenu z układem heterocyklicznym i podstawienie grupy amidowej w położeniu 3 nadaje grupie enolowej właściwości kwasowe. Koksyby (celekoksyb, rofekoksyb, etorykoksyb, waldekoksyb) natomiast to pochodne diarylowych pięciocząłonowych układów heterocyklicznych będące selektywnymi inhibitorami COX-2 [9]. Stwierdzenie w ostatnich latach działań niepożądanych w postaci groźnych reakcji skórnych (zespołu Stevensa-Johnsona) oraz częstszego występowania powikłań sercowo-naczyniowych (ryzyko wystąpienia zawału serca lub udaru mózgu [10]) spowodowało wycofanie z rynku preparatów zawierających izoksydam, rofekoksyb i waldekoksyb [11, 12].

9. A. Zejc, M. Górczyca, Chemia leków, Wyd. Lek. PZWL, 2008

10. J.M. Wright, CMAJ, 167, 1131-1137, 2002

11. Merck Announces Voluntary Worldwide Withdrawal of VIOXX®:
http://www.vioxx.com/vioxx/documents/english/vioxx_press_release.pdf (17.11.2004)

12. <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/press/pus/35823405.pdf>

Prezentowane opracowanie wypełnia pewne niedostatki w dostępnej literaturze w postaci zaproponowanych nowych procedur analitycznych służących do analizy jakościowej i ilościowej wybranych leków w preparatach farmaceutycznych oraz materiale biologicznym, a także oszacowania prawdopodobnych dróg degradacji tych substancji wykorzystując technikę chromatografii cienkowarstwowej z densytometryczną detekcją. Ze względu na fakt dużej dostępności leków z grupy NLPZ oraz wielu możliwych działań niepożądanych celowym wydaje się badanie ich właściwości, by w miarę możliwości unikać komplikacji mogących wynikać ze stosowania tych leków.

Zagadnienia dotyczące analityki i interpretacji wyników są obszernie dyskutowane w piśmiennictwie, a naukowcy stale dążą do uzyskania większej szybkości procesu analitycznego przy dużej dokładności oznaczeń i coraz pewniejszej interpretacji wyników, przy uwzględnieniu względów ekonomicznych i ekologicznych.

Kompleksowe podejście realizuje główny cel niniejszej pracy, jakim jest dostarczenie analitykowi narzędzi do oceny substancji leczniczych, poprzez rozstrzygnięcie kwestii tj.:

- określenie rodzaju substancji
- oznaczenie zawartości składnika czynnego w postaciach leku
- ocena trwałości składników pod wpływem zmiennych warunków środowiska
- określenie stężeń substancji w materiale biologicznym
- przewidywanie charakteru hydrofilo-lipofilowego substancji.

3.3.1. Warunki identyfikacji i analiza ilościowa oksykamów i koksybów w materiale o zróżnicowanej matrycy

Początkowym etapem procesu optymalizacji rozdziału chromatograficznego było opracowanie warunków w celu zwiększenia selektywności rozdzielania m.in. poprzez określenie mechanizmu retencji, dobór fazy stacjonarnej, modyfikacje składu fazy ruchomej, sposób rozwijania chromatogramów (elucja izokratyczna, gradientowa), ustalenie rodzaju komory chromatograficznej, czasu jej saturacji, długości rozwijania chromatogramów, a także objętości nanoszonych próbek. Zebrane eksperymentalnie informacje stanowiły podstawę do opracowania procedury analitycznej służącej do identyfikacji rozdzielanych składników oraz ich oznaczania ilościowego.

Realizację zamierzeń chromatograficznej analizy wybranych substancji rozpoczęto od przeprowadzenia studium literaturowego, w celu usystematyzowania wiedzy na temat dostępnych metod analitycznych stosowanych w badaniach NLPZ, ze szczególnym uwzględnieniem oksykamów i koksybów [H1, H3]. Poza porównaniem warunków analiz spektrofotometrycznych, chromatograficznych, woltamperometrycznych i innych, przedyskutowano parametry walidacji opisanych metod, co umożliwia analitykowi skonfrontowanie wyników badań własnych z opublikowanymi danymi i wyciągnięcie wniosków co do celowości prowadzonych analiz. Pomaga to dokonać wyboru i ewentualnej

adaptacji właściwej procedury analitycznej, w zależności od rodzaju próbki (preparaty farmaceutyczne, matryce biologiczne), metody oznaczania oraz detekcji (dostępność aparatury). Z doniesień literaturowych wynika, że istnieje wiele różnorodnych metod badawczych stosowanych do analizy oksykamów i koksylów, różniących się selektywnością, czułością i dokładnością. Największą popularność w badaniach preparatów farmaceutycznych i materiału biologicznego zyskała metoda chromatografii cieczowej oraz spektrofotometria UV-VIS, znajdując zastosowanie do oznaczeń składników czynnych oraz w badaniach czystości, trwałości i analizie farmakokinetycznej. Automatyzacja wielu etapów procedury analitycznej i stosowanie metod łączonych powoduje wzrost możliwości badania substancji z coraz większą czułością i precyzją [13, 14]. Część dostępnych opracowań dotyczy wykorzystania metody TLC do oznaczania zawartości oksykamów i koksylów w różnych postaciach leków, oraz do badania procesów ich degradacji [15-21]. Najmniejsza ilość danych dotyczy izoksykamu, którego fotostabilność analizowano stosując techniki HPTLC, HPLC i elektroforezę kapilarną [22], a który często stosuje się jako substancję wzorcową (*internal standard*) podczas oznaczeń innych składników.

Uzyskana wiedza stała się podstawą do opracowania własnych procedur służących do analizy oksykamów i koksylów, w zakresie izolowania substancji, potwierdzania ich tożsamości oraz oznaczeń ilościowych. Konsekwencją tych działań było opracowanie nowych metod analizy jakościowej i ilościowej piroksykamu, meloksykamu, tenoksykamu, izoksykamu, celekoksybu, etorykoksybu, rofekoksybu i waldekoksybu; badania procesu degradacji wymienionych związków w warunkach zmiennego pH i temperatury; analiza otrzymanych produktów oraz możliwych dróg degradacji; ustalenie warunków do oznaczeń rutynowych substancji w preparatach farmaceutycznych i w materiale biologicznym oraz ocena charakteru lipofilowego omawianych związków.

W pierwszym etapie pracy postanowiono ustalić i zoptymalizować nowe warunki do analizy w/w substancji, poprzez dobór fazy stacjonarnej i fazy ruchomej. Eksperymentalnie sprawdzono różne adsorbenty oraz mieszaniny rozpuszczalników (m.in. cykloheksanu, heptanu, toluenu, dichlorometanu czy octanu etylu z acetonem, propanolem, amoniakiem czy butyloamina) w różnych proporcjach, bazując na danych literaturowych i szeregu eluotropowym. Ostatecznie zdecydowano prowadzić badania piroksykamu, tenoksykamu, meloksykamu oraz izoksykamu na płytkach TLC pokrytych żelem krzemionkowym z czynnikiem fluoryzującym F₂₅₄ i eluentem o składzie:

-
13. A. Crecelius, M.R. Clench, D.S. Richards, V. Parr, J. Pharm. Biomed. Anal., 35, 31-39, 2004
 14. H. Bartsch, A. Eiper, H. Kopelent-Frank, E. Sakka, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol., 25, 2821-2831, 2002
 15. S.P. Puthli, P.R. Vavia, J. Pharm. Biomed. Anal., 22, 673-677, 2000
 16. S. Chandal, C.R. Barhate, A.R. Srivastava, S.R. Kulkarni, C.J. Kapadia, Indian J. Pharm. Sci., 74, 36-40, 2012
 17. E.A. Taha, N.N. Salama, El.-S. Abdel Fattah, J. AOAC Int., 87, 366-373, 2004
 18. H. Hopkała, A. Pomykański, J. Planar Chromatogr.-Modern TLC, 16, 107-111, 2003
 19. N. Desai, P. Amin, J. Pharm. Sci., 70, 644-647, 2009
 20. H. Bartsch, A. Eiper, H. Kopelent-Frank, J. Pharm. Biomed. Anal., 20, 531-541, 1999; 21, 1275-1276, 2005
 21. L.I. Bebaawy, Spectrosc. Lett., 31, 797-820, 1998
 22. H. Bartsch, A. Eiper, K. Habiger, H. Kopelent-Frank, J. Chromatogr. A, 846, 207-216, 1999

octan etylu : toluen : butyloamina (2:2:1, v/v/v), otrzymując dobrze wykształcone i symetryczne piki [**H2**, **H5**, **H6**, **H7**]. Detekcję densytometryczną prowadzono w zakresie UV (200-400 nm), wykorzystując do identyfikacji substancji wartości R_F i widma absorpcji rejestrowane bezpośrednio z chromatogramów. Na densytogramach zarejestrowanych dla piroksykanu przy analitycznej długości fali $\lambda=360$ nm zaobserwowano pik o wartości współczynnika opóźnienia $R_F = 0,53$ [**H2**]. Następnie przebadano dostępne preparaty farmaceutyczne (kapsułki, iniekcje) zawierające piroksykan jako substancję czynną, stwierdzając, że w opracowanych warunkach na chromatogramach obecny jest tylko jeden pik, pochodzący od tej substancji. Część dostępnych preparatów zawiera piroksykan w postaci połączenia kompleksowego z β -cyklodekstryną; wzrasta wtedy rozpuszczalność i szybkość wchłaniania leku, co wpływa na lepszy efekt kliniczny. Roztwory tych preparatów przygotowywano rozpuszczając odważki w 0,5 M HCl, ogrzewając w temperaturze 60°C i dopełniając acetonem do wymaganej objętości. Na densytogramach stwierdzono obecność dodatkowego pików poza pikiem pochodzącym od substancji czynnej, przy $R_F = 0,62$. W wyniku długiego ogrzewania tych roztworów dochodziło do całkowitego zaniku pików piroksykanu i powstawania kolejnego, przy $R_F = 0,82$. Poza położeniem na densytogramach otrzymane piki różniły się także widmami absorpcji z charakterystycznymi maksimami tj. 293 i 360 nm dla piroksykanu, 233 i 297 nm dla pików o $R_F = 0,62$ oraz 220 i 375 nm dla pików o $R_F = 0,82$. Prowadzono więc analizę przy dwóch różnych długościach fali (360 i 297 nm), co pozwoliło na równoczesną rejestrację pików, pochodzących zarówno od piroksykanu jak i ewentualnych produktów degradacji.

Dobrze wykształcone piki o $R_F = 0,52$ otrzymano także dla tenoksykanu i $R_F = 0,64$ dla substancji wzorcowej pirydyno-2-aminy, stanowiącej wg Farmakopei ewentualne zanieczyszczenie [**H5**, **23**]. Bezpośrednio z chromatogramów zarejestrowano widma absorpcji, uzyskując charakterystyczne maksima przy 272 i 373 nm dla tenoksykanu i 297 nm dla pirydyno-2-aminy. Do dalszych pomiarów wybrano $\lambda=288$ nm, gdyż przy tej długości fali możliwe jest równoczesne oznaczanie tenoksykanu obok zanieczyszczenia z wystarczająco dużą czułością, co pozwala na skrócenie czasu analizy. W badaniach meloksykanu na densytogramach otrzymano pik o $R_F = 0,56$, wykazujący maksima absorpcji przy 297 i 365 nm. Do analizy wybrano $\lambda=297$ nm, przy której nie stwierdzono obecności żadnych dodatkowych pików mogących pochodzić od ewentualnych zanieczyszczeń [**H6**].

Na chromatogramach dla roztworów wzorcowych izoksykanu o stężeniu do ok. 3 μg substancji/plamę obecna była jedna plama o $R_F = 0,56$ [**H7**]. Natomiast dla roztworów o większych stężeniach, poza pikiem pochodzącym od substancji czynnej, pojawiał się dodatkowy pik o $R_F = 0,40$. Zarejestrowane widma absorpcji przedstawiały dobrze wykształcone maksima przy długościach fali 256 i 350 nm dla izoksykanu oraz 360 nm dla zanieczyszczenia. Do dalszych badań wybrano $\lambda=350$ nm, przy której obydwa związki wykazują wysokie wartości absorbancji.

Analogiczne badania podjęto w celu opracowania metody oznaczania rofekoksybu, leku z grupy koksylów, wysoce selektywnych inhibitorów COX-2 [H4]. W dostępnej literaturze obecne są metody TLC dotyczące równoczesnego oznaczania rofekoksybu obok tyzanidyny [24, 25]. Ustalono i zoptymalizowano warunki analizy rofekoksybu na płytkach TLC F₂₅₄ pokrytych żelem krzemionkowym jako fazą stacjonarną oraz mieszaniną o składzie: chloroform : aceton : toluen : stężony kwas octowy (12:5:2:0,1, v/v/v/v) jako fazą ruchomą. Poczynione obserwacje szybszego rozkładu pod wpływem światła zobligowały do prowadzenia badań w zaciemnionym pomieszczeniu, osłaniając stosowane roztwory oraz płytki w trakcie analizy. Na densytogramach otrzymano dobrze wykształcone piki o $R_F = 0,69$ dla rofekoksybu oraz widma absorpcji z maksimum przy $\lambda = 291$ nm. Po wstępnych badaniach rozkładu tej substancji na chromatogramach zaobserwowano obecność dodatkowych pików o różnych wartościach R_F , pochodzących od produktów degradacji. Zarejestrowane widma absorpcji skłoniły do wyboru długości fali 256 nm do dalszych pomiarów, przy której zarówno rofekoksyb, jak i powstające produkty wykazują stosunkowo wysokie wartości absorbancji. Pozwoliło to na równoczesną analizę wszystkich składników w tym samym czasie, w jednej analizie, co znacząco wpłynęło na szybkość procesu.

Omawiane powyżej warunki chromatograficznej separacji pozwalają na analizę jakościową i ilościową wybranych związków w obecności ewentualnych zanieczyszczeń czy produktów degradacji. Pomimo, że badane substancje nie występują razem w postaci leku, to z punktu widzenia analytyka interesującym jest możliwość rozdzielenia wybranych substancji obok siebie, zwłaszcza dotyczy to związków o podobnej budowie chemicznej, wykazujących podobne właściwości fizykochemiczne. W dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji opisującej skuteczny sposób rozdzielania tych substancji metodą chromatograficzną. Kilka oksykamów było analizowanych techniką LC-MS/MS po ekstrakcji z fazy stałej z próbek krwi [26], natomiast koksylby oznaczano techniką UPLC w obecności innych leków z grupy NLPZ w płynach ustrojowych [27]. Do oznaczania meloksykamu obok celekoksylu i rofekoksylu stosowano także elektroforezę kapilarną [28].

Przedmiotem dalszej pracy było ustalenie warunków równoczesnej identyfikacji i oznaczania ilościowego celekoksylu obok etorykoksylu i waldekoksylu [H8]. Optymalizacja warunków doprowadziła do otrzymania dobrze wykształconych i rozdzielonych pików wszystkich składników przy zastosowaniu płytek chromatograficznych TLC F₂₅₄ pokrytych żelem krzemionkowym jako fazy stacjonarnej oraz mieszaniny: chloroform : aceton : toluen (12:5:2, v/v/v) jako fazy ruchomej. Badane substancje różniły się nie tylko pozycją na densytogramie ($R_F = 0,65$ dla celekoksylu, $R_F = 0,32$ dla etorykoksylu i $R_F = 0,57$ dla waldekoksylu) ale także widmami absorpcji z charakterystycznymi maksimami przy 254 nm dla celekoksylu, 235 i 290 nm dla etorykoksylu oraz 254 nm dla waldekoksylu.

24. T.K. Ravi, M. Gandhimathi, K.R. Sireesha, S. Jacob, Indian J. Pharm. Sci. 68, 234-236, 2006

25. U.D. Pawar, A.V. Sulebhavikar, A.V. Naik, S.G. Pingale, K.V. Mangaonkar, E-J. Chem., 6, 295-302, 2009

26. J. Shirako, M. Kawasaki, K. Komine, Y. Kunisue, M. Terada, Ch. Sasaki, W. Irie, Ch. Murakami, K. Tonooka, K. Tomobe, T. Shinozuka, Forensic Sci. int., 227, 100-102, 2013

27. V.V. Pavan Kumar, M.C.A. Vinu, A.V. Ramani, R. Mullangi, N.R. Srinivas, Biomed. Chromatogr., 20, 125-132, 2006

28. Y.H. Hiseh, S.J. Lin, S.H. Chen, J. Sep. Sci., 29, 1009-1017, 2006

Do dalszych badań wybrano dwie długości fali; $\lambda_1=254$ nm do oznaczania celekoksylu i waldekoksylu oraz $\lambda_2=290$ nm do etorykoksylu. Następnie dokonano oznaczeń wybranych koksylów w preparatach farmaceutycznych (kapsułki, tabletki). Uzyskano wyniki pozwalające prowadzić selektywną analizę badanych związków i otrzymanie powtarzalnych wyników bez interferencji składników matrycy. Metoda jest szybka i z powodzeniem może być zastosowana do analizy kilku leków obok siebie na jednej płytce, co pozwala wykorzystać ją w rutynowych analizach.

W analogiczny sposób postanowiono potraktować grupę oksykamów [H9]. W efekcie optymalizacji warunków rozdzielania, do badań wybrano płytki chromatograficzne TLC F₂₅₄ pokryte żel krzemionowym jako fazę stacjonarną oraz eluent o składzie: octan etylu : etanol : toluen : 25% amoniak (6:3:1:2 krople, v/v/v). Otrzymano zwarte plamy pochodzące od piroksykanu, meloksykanu, tenoksykanu oraz izoksykanu, o zróżnicowanych wartościach R_F (dla piroksykanu 0,53, meloksykanu 0,78, tenoksykanu 0,61 oraz izoksykanu 0,82), co wskazuje na dobry rozdział badanych składników. Po przeanalizowaniu widm absorpcji zdecydowano o wyborze $\lambda=360$ nm, przy której wszystkie badane substancje wykazywały wysokie wartości absorbancji. Opracowaną procedurę zastosowano do oznaczeń oksykamów w dostępnych preparatach farmaceutycznych. W przypadku przebadanych postaci leków (kapsułek, tabletek, ampułek) na densytogramach nie stwierdzono obecności dodatkowych pików mogących pochodzić od składników współobecnych lub zanieczyszczeń, a uzyskane zawartości poszczególnych substancji czynnych są bliskie wartościom deklarowanym ($RSD < 0,72\%$).

Bardzo istotnym etapem każdej procedury analitycznej jest przygotowanie próbki [29, 30]. Wybór odpowiedniej techniki do izolacji związków zależy zarówno od właściwości substancji ekstrahowanych jak i od matrycy [31]. Omówione powyżej warunki dotyczyły analizy substancji w preparatach farmaceutycznych. Składniki te były oznaczane w płynach ustrojowych techniką HPLC, a także HPLC-MS/MS [32, 33]. Metody te wymagają złożonego procesu przygotowania próbki i zużycia dużych ilości rozpuszczalników. W kolejnym etapie pracy podjęto badania wybranych leków w materiale biologicznym, w próbkach krwi i moczu [H10]. Roztwory wzorcowe piroksykanu, tenoksykanu, celekoksylu i rofekoksylu przygotowane w dwóch rozpuszczalnikach różniących się polarnością, tj. metanolu (siła elucyjna $\epsilon^0 \sim 0,95$) i acetonie ($\epsilon^0 \sim 0,56$), dodawano do próbek krwi lub moczu, po odwirowaniu ekstrakty poddano analizie na płytkach TLC F₂₅₄ pokrytych żel krzemionkowym z zastosowaniem eluentów o składzie: octan etylu : toluen : butyloamina (2:2:1, v/v/v) do oznaczania piroksykanu i tenoksykanu, oraz chloroform : aceton : toluen (12:5:2, v/v/v) do oznaczania celekoksylu i rofekoksylu. Detekcję prowadzono przy długości fali $\lambda_1=360$ nm dla piroksykanu i tenoksykanu, $\lambda_2=254$ nm dla celekoksylu oraz $\lambda_3=301$ nm

29. S. Mitra, *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, Wiley-Interscience, John Wiley&Sons Inc., 2003

30. C. Bydla, R. Thiele, U. Kobold, D.A. Volmer, *Analyst*, 139, 2265-2276, 2014

31. J. Namieśnik, P. Szefer, *Ecol. Chem. Eng.*, 15, 167- 249, 2008

32. H.Y. Ji, H.W. Lee, Y.H. Kim, D.W. Jeong, H.S. Lee, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, 826, 214-219, 2005

33. H.G. Gika, A. Theodoridou, F. Michopoulos, G. Theodoridis, E. Diza, L. Settas, P. Nikolaidis, C. Smith, I.D. Wilson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 49, 579-586, 2009

dla rofekoksybu. W efekcie otrzymano symetryczne, dobrze wykształcone piki o wartościach R_f : 0,54, 0,56, 0,77 i 0,72, odpowiednio dla piroksykanu, tenoksykanu, celekoksybu i rofekoksybu. Procedura optymalizacji analizy, poza ustaleniem warunków rozdzielania, dotyczyła także określenia stosunku ilości substancji oznaczanej do ilości krwi lub moczu. Stwierdzono, że analizowane związki są dobrze rozdzielone w odniesieniu do składników matrycy (wydajność ekstrakcji ok. 100%).

Podsumowując można stwierdzić, że TLC z densytometryczną detekcją jest prostą, szybką i dokładną metodą do analizy oksykanów i koksyków. Można ją wykorzystać do równoczesnego badania związków o podobnej strukturze chemicznej. Nawet jeżeli wybrane substancje nie występują równocześnie w postaci leku, to prezentowane procedury obok wartości naukowej mogą mieć zastosowanie aplikacyjne do rutynowych analiz w laboratoriach klinicznych. Pozwalają analitykowi monitorować zawartość badanych leków, co znacznie skraca czas badań i przekłada się m.in. na czas oczekiwania na wyniki. Przedstawiona procedura jest jak dotychczas najefektywniejszym sposobem na rozdzielanie badanych substancji na poziomie niskich stężeń, przy użyciu TLC na żelu krzemionkowym.

3.3.2. Walidacja opracowanych metod

Poznanie zasad nowoczesnej optymalizacji rozdzielania chromatograficznego, sprawne i wiarygodne wykonanie rozdzielania mieszaniny substancji leczniczych obok zanieczyszczeń i substancji pokrewnych wraz z poprawnie przeprowadzoną walidacją metody analitycznej stanowi podstawę współczesnej analizy farmaceutycznej [34]. Wymagania dla poszczególnych substancji lub produktu farmaceutycznego zawarte są w odpowiednich dokumentach, tj. monografie farmakopealne czy wytyczne Międzynarodowej Konferencji Harmonizacji Wymagań dla Leków (ICH) [23, 35, 36].

Omówione w pracy warunki separacji zostały zwalidowane zgodnie z zasadami ICH, poprzez określenie specyficzności, liniowości, dokładności i precyzji metody oraz LOD i LOQ, a uzyskane wyniki oceniono statystycznie. Na densytogramach stwierdzono dobry rozdział badanych związków oraz brak interferencji ze składnikami matrycy, co potwierdza selektywność metody. Metoda jest także specyficzna względem oznaczanych substancji, co stwierdzono w oparciu o wartości R_f oraz widma absorpcji dla roztworów wzorcowych i próbek, nie stwierdzając obecności dodatkowych pików poza pikami pochodzącymi od substancji badanych. Zarejestrowane widma absorpcji nie wykazywały żadnych różnic względem widm otrzymanych dla wzorców. Liniowość i zakres metody wyznaczono poprzez określenie zależności pomiędzy polami powierzchni pików substancji wzorcowych

34. G. Matysik, *Problemy optymalizacji chromatografii cienkowarstwowej*, Akademia Medyczna w Lublinie, Lublin, 1997

35. European Pharmacopoeia, 6th edition, Council of Europe

36. The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Geneva, Switzerland

a stężeniem analitu. Otrzymane równania regresji pozwoliły ustalić zakres oznaczanych stężeń (2-110 µg/ml dla piroksykanu, 35-1820 mg/ml dla tenoksykanu, 50-2100 µg/ml dla meloksykanu, 60-400 µg/ml dla rofekoksybu) z wysokimi wartościami współczynników korelacji $r \approx 0,99$ [H2, H4, H5, H6]. Wykonano także analizę reszt, która w każdym przypadku nie wykazywała żadnych trendów w zakresie roboczym stężeń. W oparciu o parametry regresji obliczono LOD i LOQ uzyskując niskie wartości, odpowiednio 0,07 i 0,20 µg piroksykanu/plamę, 0,86 i 2,60 mg tenoksykanu/plamę, 0,96 i 2,90 µg meloksykanu/plamę, 0,22 i 0,67 µg izoksykanu/plamę i 0,35 i 1,05 µg rofekoksybu/plamę, co świadczy o dużej czułości metod. W każdym przypadku otrzymano dużą zgodność wyników (precyzja: RSD < 1,5 %). Dokładność metody, zmierzoną na trzech poziomach stężeń, określono jako procent odzysku substancji wzorcowej dodanej w ilościach 80-120 % do preparatu, otrzymując wyniki w zakresie od 99 do 102 % (RSD < 2 %).

Kontynuując pracę postanowiono sprawdzić przydatność nowych metod do oznaczania zawartości składnika w preparatach. Wyniki oznaczeń w przebadanych postaciach leków były zbliżone do wartości deklarowanej, a na chromatogramach zaobserwowano obecność pojedynczego piku pochodzącego od substancji czynnej, bez interferencji od składników współobecnych lub zanieczyszczeń. Opracowane metody spełniają więc kryteria walidacji dla metod analitycznych i mogą być zastosowane do oznaczeń jakościowych i ilościowych substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych.

W przypadku analizy kilku składników obok siebie na densytogramach nie stwierdzono obecności dodatkowych plam poza pochodzącymi od substancji czynnych [H8, H9]. Wykreślone zależności pól powierzchni pików od stężenia każdej substancji pozwoliły określić zakres metody (40-600 µg/ml dla celekoksybu, 20-600 µg/ml dla etorykoksybu, 40-500 µg/ml dla waldekoksybu, 7-40 µg/ml dla piroksykanu i tenoksykanu, 5-40 µg/ml dla meloksykanu, 7-50 5-40 µg/ml dla izoksykanu) przy dobrej korelacji wyników ($r > 0,996$). Analiza reszt wykazała brak widocznych trendów w badanych zakresach stężeń. Następnie określono Wartości LOD i LOQ poniżej 0,08 µg/plamę dla każdej substancji, dowodzą wysokiej czułości prezentowanych metod. Uzyskano także zadowalającą precyzję metody (RSD < 2 %), a odzysk analitu bliski 100 % (RSD < 1 %) potwierdził dokładność oznaczeń. Prezentowana metoda może być dobrym narzędziem w analizie rutynowej, dającym możliwość równoczesnego oznaczania obok siebie substancji o podobnej strukturze i właściwościach.

W przypadku walidacji metody oznaczania składników w matrycy biologicznej analiza densytogramów otrzymanych dla metanolowych i acetonowych ekstraktów leków z krwi lub moczu pozwoliła stwierdzić brak dodatkowych pików mogących pochodzić od składników matrycy [H10]. Jedynie w przypadku acetonowych ekstraktów próbek moczu, poza pikami pochodzącymi od oznaczanych substancji stwierdzono obecność jednego dodatkowego piku o $R_f = 0,16$, bardzo dobrze rozdzielonego od pozostałych, pochodzącego prawdopodobnie od innego leku przyjmowanego przez pacjentkę lub jego metabolitu. Można więc stwierdzić, że metoda jest selektywna i specyficzna względem badanych leków i pozwala w prosty

sposób uzyskać ich dobry rozdział od składników złożonej matrycy. Wyznaczono zakres metody (1,4-37 $\mu\text{g/ml}$ dla piroksykanu i tenoksykanu, 2,8-38 $\mu\text{g/ml}$ dla celekoksybu i rofekoksybu; $r \sim 0.99$) i przeprowadzono analizę reszt nie otrzymując żadnych wyraźnych zależności, co potwierdza liniowy charakter otrzymanych wyników. Wartości LOD i LOQ (od 0,06 do 0,32 $\mu\text{g/plamę}$) wskazują na wysoką czułość metody. Wyniki testów statystycznych Levene'a i Browna-Forsythe'a nie wykazały żadnych znaczących różnic ($p > 0,05$) między roztworami metanolowymi i acetonowymi, można więc stwierdzić, że wybór rozpuszczalnika nie wpływa na wyniki oznaczeń. Precyzja metody, wyrażona poprzez RSD, była wysoka i mieściła się w zakresie 0,48 do 1,82 %, a wartość odzysku była bliska 100 %. Ponadto zbadano stabilność piroksykanu, tenoksykanu, celekoksybu i rofekoksybu prowadząc inkubację mieszaniny leku z próbkami krwi lub moczu w temperaturze 37°C w czasie 1, 2 i 3 h. Na densytogramach nie stwierdzono obecności żadnych dodatkowych pików poza pikami pochodzącymi od substancji oznaczanych i stężenia substancji badanych nie uległy zmianie, czyli nie zachodził ich rozkład w opisanych warunkach.

Podsumowując można stwierdzić, że opracowane metody mogą być z powodzeniem stosowane do identyfikacji i oznaczania ilościowego wybranych związków ze zróżnicowanej matrycy (leki, krew, mocz). Otrzymane wyniki potwierdzają brak wpływu składników matrycy na położenie pików na densytogramach i zawartość piroksykanu, tenoksykanu, celekoksybu i rofekoksybu w próbkach. Procedura analityczna jest prosta w wykonaniu, zapewnia dużą wydajność ekstrakcji i rozdzielczość oznaczanych związków. Pomimo, że badane związki nie występują jednocześnie w leku to opracowane warunki mogą stanowić użyteczne narzędzie do monitorowania ich obecności w próbkach w laboratorium klinicznym, gdzie często prostota wykonania eksperymentu przekłada się na oszczędność czasu i odczynników.

3.3.3. Ocena kinetyczna i termodynamiczna trwałości wybranych substancji

Substancje mogą ulegać degradacji, zarówno w postaci czystej jak i produkcie leczniczym. Reakcje te mogą prowadzić do zmiany właściwości, a docelowo utraty aktywności leczniczej. Ponadto powstające produkty mogą powodować niepożądane skutki uboczne, a nawet być toksyczne. Wiedza na temat przebiegu tych procesów oraz znajomość powstających produktów jest więc bardzo istotna. W literaturze dostępne są prace dotyczące procesów fotodegradacji wybranych oksykanów i koksibów [14, 20, 22, 37, 38] oraz reakcji degradacji w środowisku alkalicznym [17, 21, 39]. Jednakże brak prac prezentujących zachowanie substancji w zależności od środowiska w szerokim zakresie pH, równocześnie pozwalających na identyfikację powstających produktów. Stąd pomysł sprawdzenia stabilności wybranych oksykanów i koksibów z wykorzystaniem opracowanych

37. M.A. Shehata, N.Y. Hassam, A.S. fayed, B.A. El-Zeany, *Il Farmaco*, 59, 139-145, 2004

38. E. Nemutlu, N. Ozaltin, S. Altinoz, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378, 504-509, 2004

39. M.A. Shehata, N.Y. Hassa, B.A. El-Zeany, *Anal. Chim. Acta*, 519, 23-30, 2004

metod TLC z detekcją densytometryczną oraz HPLC z detekcją masową do separacji i identyfikacji składników.

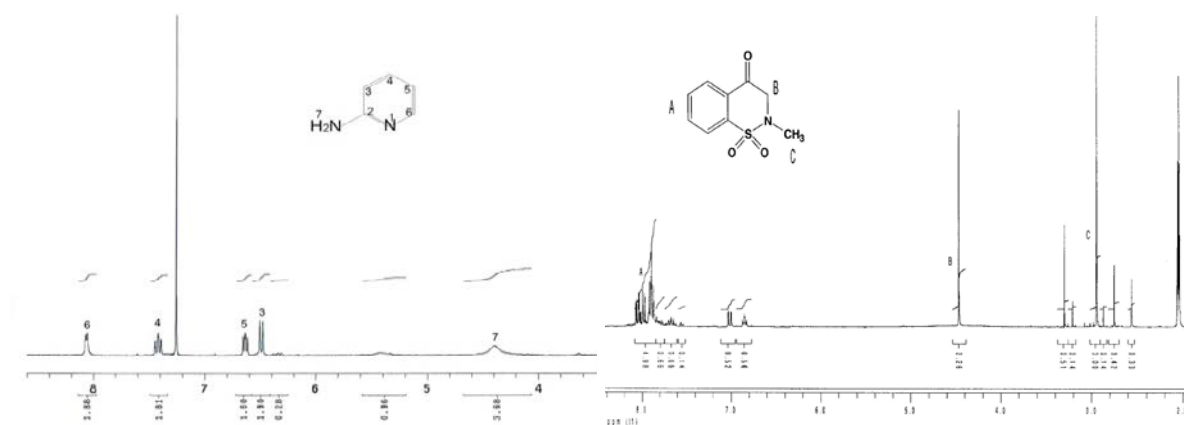
Podczas optymalizacji warunków rozdziału zaobserwowano, że w środowisku kwasowym oraz pod wpływem temperatury piroksydam ulega degradacji z utworzeniem nowych produktów [H2]. Przeanalizowano więc wpływ pH, temperatury i czasu inkubacji na stabilność piroksydamu, tenoksydamu, meloksydamu, izoksydamu i rofekoksybu w roztworach, wykorzystując opracowane i zwalidowane metody. Odważki substancji rozpuszczano w roztworach HCl i NaOH o stężeniach 0,1 M, 0,5 M, 1 M i 3 M i inkubowano przez czas określony planem badań, w podwyższonej temperaturze, w szczelnie zamkniętych ampułkach. Zaobserwowano, że w środowisku kwasowym obok piku pochodzącego od piroksydamu powstają dwa piki o wartościach $R_F = 0,62$ i $0,82$, natomiast w środowisku alkalicznym tylko jeden, przy $R_F = 0,62$ [H2]. Po inkubacji próbek zawierających tenoksydam stwierdzono, że zarówno w kwasowym jak i zasadowym środowisku, poza pikiem pochodzącym od substancji czynnej o $R_F = 0,52$ obecne są piki pochodzące od produktów degradacji [H5]. W środowisku kwasowym obecne były trzy dodatkowe piki o $R_F = 0,64$, $0,76$ i $0,88$, natomiast w środowisku zasadowym dwa, o $R_F = 0,64$ i $0,76$. W zależności od środowiska reakcji, także w przypadku meloksydamu na chromatogramach zaobserwowano różną ilość dodatkowych pików, poza pikiem pochodzącym od substancji czynnej [H6]. W środowisku kwasowym obecne były dwa nowe produkty o $R_F = 0,64$ i $0,76$, podczas gdy w środowisku zasadowym stwierdzono obecność trzech produktów, przy $R_F = 0,64$, $0,76$ i $0,88$. Obecność dodatkowych pików o różnych wartościach R_F stwierdzono także w trakcie badań izoksydamu, co sugeruje wpływ środowiska na jego stabilność [H7]. Stężenie izoksydamu zmniejszało się, tak w roztworach kwasowych jak i zasadowych na rzecz powstających produktów. W roztworach kwasowych powstawały trzy produkty ($R_F = 0,12$, $0,41$ i $0,65$), w przeciwieństwie do środowiska alkalicznego, gdzie zaobserwowano dodatkowo cztery produkty ($R_F = 0,12$, $R_F = 0,30$, $R_F = 0,41$, $R_F = 0,65$).

Wszystkie otrzymane piki były dobrze wykształcone i nie interferowały między sobą. Powstające substancje miały także różne widma absorpcji z charakterystycznymi maksimami. Otrzymane wyniki zmian zawartości badanych substancji w analizowanych próbkach stanowiły podstawę do obliczeń kinetycznych i termodynamicznych, opisujących proces degradacji związku. Wyznaczono rzędowość reakcji, obliczono stałe szybkości reakcji, czasy $t_{0,5}$ i $t_{0,1}$ oraz wartości energii aktywacji, które sugerują, że piroksydam, tenoksydam, meloksydam i izoksydam są substancjami stosunkowo stabilnymi. Równocześnie, uzyskane wyniki potwierdzają wpływ zarówno pH, temperatury jak i czasu inkubacji na szybkość procesu ich degradacji. Proces degradacji piroksydamu i tenoksydamu zachodzi szybciej w środowisku kwasowym niż w zasadowym i wiąże się z powstaniem większej ilości produktów [H2, H5]. Natomiast meloksydam i izoksydam są mniej trwałe w środowisku zasadowym [H6, H7]. Obliczone parametry kinetyczne i termodynamiczne potwierdzają powyższe wnioski.

W przypadku rofekoksybu roztwory do inkubacji w temperaturach 37, 65 i 90°C sporządzano w roztworach HCl i NaOH o stężeniach 0,01 M i 0,1 M oraz wodzie destylowanej

[H4]. Z uwagi na zaobserwowaną wrażliwość tego związku na światło czynności były wykonywane w zaciemnieniu. Równocześnie jeden z roztworów był inkubowany w temperaturze pokojowej (ok 23°C) przy dostępie światła słonecznego. Po czasie określonym planem badań stwierdzono, że liczba i stężenie powstających produktów są różne w środowisku kwasowym i zasadowym. Zaobserwowano obecność dobrze rozdzielonych pików o różnych wartościach R_F i widmach absorpcji. Część powstających pików wykazuje wartości R_F bliskie R_F dla rofekoksybu, co sugeruje, że struktura i właściwości tych związków są do siebie zbliżone. Równocześnie, szybkość degradacji rofekoksybu w roztworach wystawionych na działanie światła słonecznego była większa niż w pozostałych. Ustalono rzędowość reakcji, obliczono wartości kinetyczne oraz energię aktywacji. Degradacja rofekoksybu zachodzi znacznie szybciej w roztworach zasadowych niż w wodzie czy środowisku kwasowym. Zarówno liczba dodatkowych pików jak i ich powierzchnia jest większa w środowisku zasadowym i w roztworach wystawionych na działanie światła. Z uwagi na zbyt małą ilość otrzymanych substancji, w oparciu o zarejestrowane widma ^1H NMR, nie można było potwierdzić struktury powstałych produktów.

W dalszym etapie pracy podjęto próby identyfikacji substancji powstających w procesie degradacji oksykamów, na podstawie wartości R_F oraz widm absorpcji otrzymanych metodą TLC. Próbkę po hydrolizie rozdzielano na chromatotronie, a poszczególne frakcje poddawano analizie ^1H NMR oraz HPLC-MS/MS. Analiza widm ^1H NMR produktów rozkładu piroksykamu [H2] wykazała obecność charakterystycznych sygnałów pozwalających zidentyfikować prawdopodobne produkty jego degradacji, którymi mogą być: pirydyno-2-amina oraz 2-metylo-2,3-dihydro-4H-1 λ ⁶,2-benzotiazyno-1,1,4-trion, oznaczone metodą TLC odpowiednio jako zanieczyszczenia o $R_F = 0,62$ i $0,82$ (Rysunek 2).

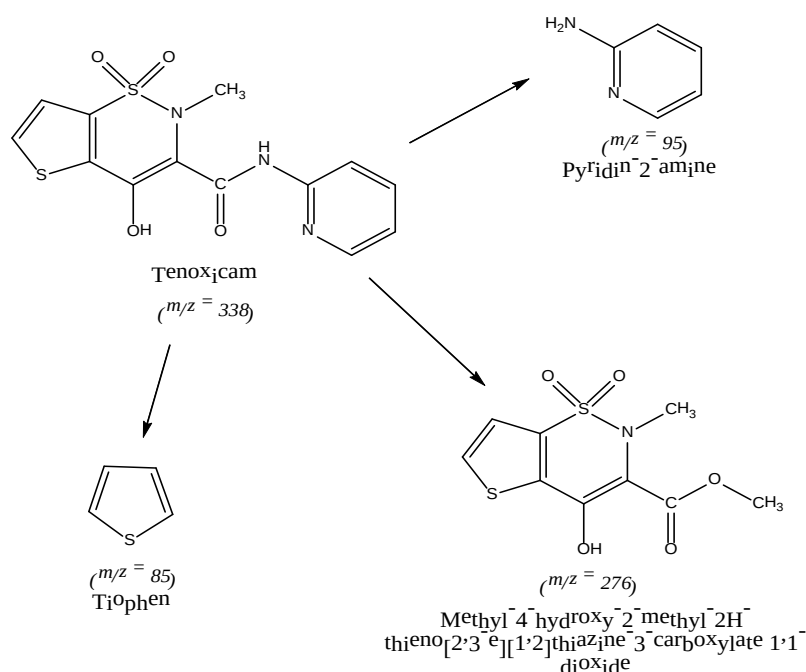


Rysunek 2. Widma ^1H NMR otrzymane dla produktów degradacji piroksykamu [H2].

Aby dodatkowo potwierdzić tożsamość produktu o $R_F = 0,62$ przeprowadzono analizę TLC stosując substancję wzorcową pirydyno-2-aminy, w omówionych wcześniej warunkach. Na densytogramach otrzymano pik, którego położenie oraz widmo absorpcji były identyczne

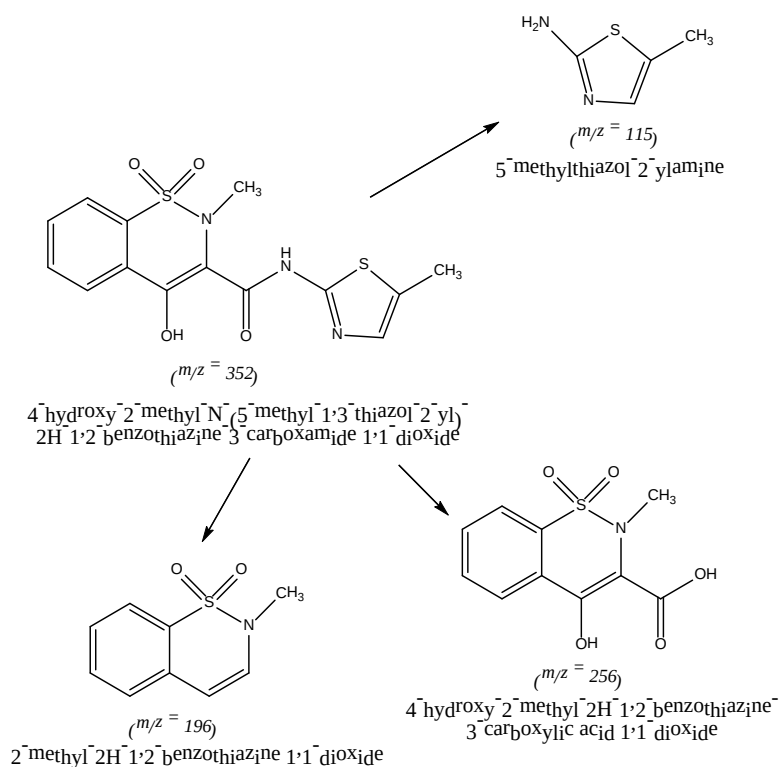
z R_F i widmami zarejestrowanymi dla zanieczyszczenia. W zaistniałej sytuacji przeprowadzono walidację metody pod kątem oznaczania pirydyno-2-aminy obok piroksykamu określając zakres liniowości (10-240 $\mu\text{g/ml}$) oraz wartości LOD i LOQ (odpowiednio 0,10 i 0,29 $\mu\text{g/plamę}$). Dokładność metody była na poziomie bliskim 100 % odzysku analitu, a precyzja pomiarów wyrażona poprzez RSD $\approx 2\%$. Zarejestrowano także widma masowe techniką HPLC-MS/MS stwierdzając obecność produktów $m/z = 95$ (zidentyfikowany jako pirydyno-2-amina), $m/z = 94$, 78 i 121 (jony $[\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2]^+$, $[\text{C}_5\text{H}_4\text{N}]^+$ i $[\text{C}_4\text{H}_3]^+$; produkty pośrednie degradacji piroksykamu) oraz $m/z = 211$ (2-metylo-2,3-dihydro-4H-1 λ^6 ,2-benzotiazyno-1,1,4-trion), potwierdzające wcześniejsze przypuszczenia co do możliwej drogi degradacji piroksykamu [H2].

Analizując widma masowe otrzymane techniką HPLC-MS/MS próbek po degradacji tenoksykamu można stwierdzić obecność sygnałów $m/z = 338$, pochodzących od tenoksykamu oraz $m/z = 276$, 254, 95 i 85, pochodzących od produktów jego rozkładu [H5]. Sygnał $m/z = 276$ prawdopodobnie pochodzi od 1,1-ditlenku metylo-4-hydroksy-2-metylo-2H-tieno[2,3-e][1,2]tiazyno-3-butyłu $[\text{M}^+]$. Fragmentacja tego związku prowadzi do powstania $m/z = 254$ $[\text{M}^+ - \text{OCH}_3]$ i 217 $[\text{M}^+ - \text{COOCH}_3]$. Dalsze przegrupowania skutkują powstaniem jonów $m/z = 82$ $[\text{C}_4\text{H}_2\text{S}^+]$, 101 $[\text{C}_4\text{H}_5\text{O}_3^+]$ i 92 $[\text{CH}_2\text{NSO}_2^+]$. Natomiast jon $m/z = 85$ może pochodzić od tiofenu, powstającego jako produkt końcowy degradacji tenoksykamu. Otrzymane wyniki pozwoliły zaproponować możliwy schemat rozkładu tenoksykamu w środowisku kwasowym (Rysunek 3). W oparciu o uzyskane informacje można przypuszczać, że głównym produktem degradacji tenoksykamu, oznaczonym w analizie TLC jako pik o $R_F = 0,64$ jest pirydyno-2-amina, natomiast produktem o $R_F = 0,76$ jest tiofen. Obecny na chromatogramach pik, pochodzący od substancji o $R_F = 0,88$ był niestabilny w warunkach oznaczenia i łatwo przekształcał się w produkt o $R_F = 0,76$.



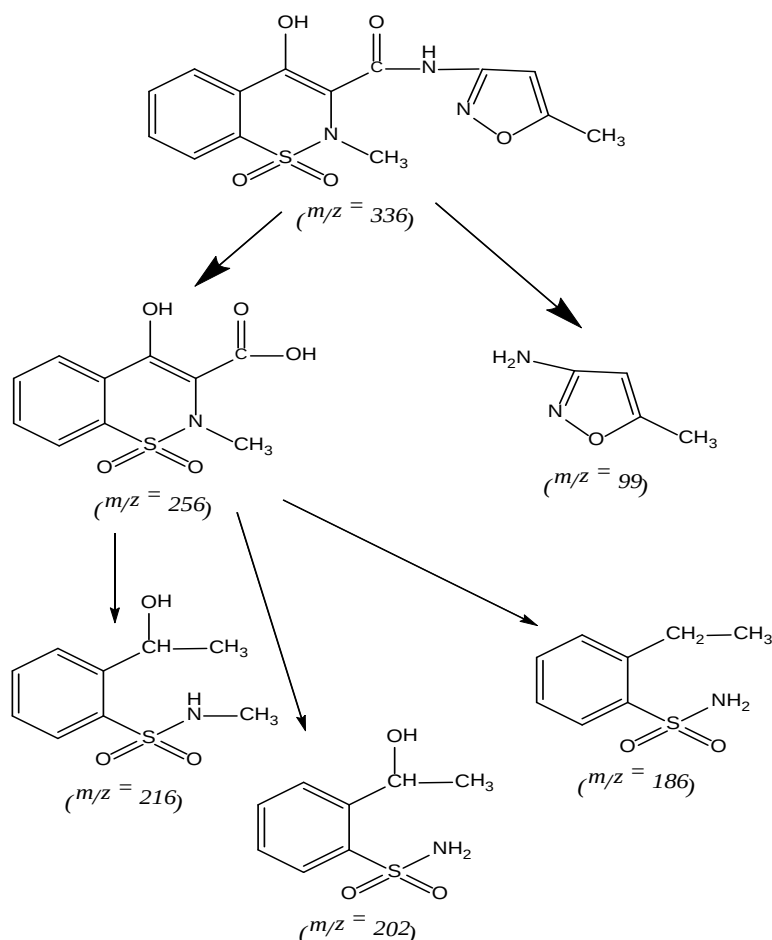
Rysunek 3. Prawdopodobny przebieg rozkładu tenoksykamu w środowisku kwasowym [H5].

Metodą HPLC-MS/MS zidentyfikowano trzy prawdopodobne produkty degradacji meloksykamu o $m/z = 115$, 196 i 256, powstałe na skutek pęknięcia wiązania amidowego w cząsteczce [H6]. Na widmach obecne były także inne jony, m.in. $m/z = 60$, 74, 155, mniej trwałe w warunkach eksperymentu. Analiza wyników TLC i widm masowych pozwoliła na zaproponowanie możliwej drogi degradacji meloksykamu: poprzez produkt pośredni 1,1-ditlenek 4-hydroksy-2-metylo-2H-1,2-benzotiazyno-3-karboksylu ($m/z = 256$), do powstania 5-metylotiazol-2-ylaminy ($m/z = 115$) oraz 1,1-ditlenku 2-metylo-2H-1,2-benzotiazyny ($m/z = 196$) (Rysunek 4).



Rysunek 4. Schemat prawdopodobnych produktów degradacji meloksykamu [H6].

Do identyfikacji produktów degradacji izoksykamu, poza TLC zastosowano także metodę HPLC-MS/MS [H7]. Otrzymane widma masowe zawierały intensywne sygnały o $m/z = 99$ i 256 oraz 186, 202 i 216. Zaproponowano możliwy przebieg procesu degradacji izoksykamu w kierunku utworzenia 5-metylooksazol-2-ylaminy ($m/z = 99$) oraz 1,1-ditlenku kwasu 4-hydroksy-2-metylo-2H-1,2-benzotiazyno-3-karboksylowego ($m/z = 256$) (Rysunek 5). Dodatkowe sygnały obserwowane na widmach mogły pochodzić od innych produktów obecnych w próbce w mniejszych ilościach, produktów pośrednich, lub związków powstających w dalszym procesie degradacji.



Rysunek 5. Prawdopodobny przebieg degradacji izoksykamu [H7].

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowane do badań metody chromatograficzne mogą być dobrym narzędziem do badania stabilności substancji leczniczej. Optymalne warunki chromatograficznej separacji pozwalają na uzyskanie prawidłowych wyników z dużą precyzją i czułością, bez interferencji ze strony składników matrycy, mogą być z powodzeniem zastosowane do identyfikacji substancji, a także monitorowania zachowania leku i prowadzenia badań kinetycznych.

3.3.4. Analiza właściwości lipofilo-hydrofilowych badanych związków

Chromatografia jest techniką wykorzystywaną nie tylko do rozdzielania mieszanin oraz jakościowego i ilościowego analizowania składników, ale również do wyznaczania różnych parametrów fizykochemicznych, m.in. badań lipofilowości. Lipofilowość charakteryzuje powinowactwo cząsteczki do fazy lipidowej i wodnej, a jej miarą jest współczynnik podziału wyrażany jako $\log P$ [3]. Analiza tego parametru zapoczątkowała systematyczne badania ilościowej zależności pomiędzy strukturą (opisywaną poprzez fizykochemiczne właściwości: R_F , zależność R_F od R_M , R_{M0}) a biologiczną aktywnością leku

(QSAR) [40]. Użycie faz stacjonarnych o różnej polarności (N-TLC, RP-TLC i ich modyfikacje) pozwala prowadzić badania związków o różnorodnych właściwościach [3, 41]. Do oznaczania lipofilowości metodą TLC powszechnie stosowane są płytki RP-18 oraz mieszaniny wody z różnymi rozpuszczalnikami jako fazy ruchome [34, 42, 43]. Dodatek organicznego modyfikatora powoduje zmniejszenie polarności fazy ruchomej (zmieniając bilans oddziaływań polarnych i apolarnych między fazą stacjonarną, ruchomą i oznaczanym związkiem) i wzrost rozpuszczalności oznaczanego związku, co powoduje wydłużenie migracji, a tym samym zwiększenie wartości parametru R_F [44].

Mając na uwadze znaczenie właściwości lipofilo-hydrofilowych do badania struktury oraz przewidywania aktywności biologicznej związków przeprowadzono analizę parametrów retencji wybranych oksykamów i koksyków z zastosowaniem TLC z odwróconym układem faz [H11]. Badane związki zawierają w cząsteczkach fragmenty heterocykliczne oraz grupy polarne, które determinują zachowanie substancji względem układu chromatograficznego. Do rozdzielania zastosowano płytki TLC RP-18 z czynnikiem fluoryzującym F_{254} jako fazę stacjonarną oraz różne fazy ruchome, w skład których wchodzi woda oraz organiczny modyfikator. Jako modyfikatory zastosowano rozpuszczalniki różniące się właściwościami i siłą elucyjną tj. metanol, aceton, 1,4-dioksan, acetonitryl i 2-propanol. Wyznaczono wartości R_F dla poszczególnych związków i w oparciu o zależność $R_M = \log [(1/R_F) - 1]$ w każdej z użytych faz ruchomych, obliczono parametry R_M . Otrzymane wyniki pozwoliły na wykreślenie zależności wartości R_M od ułamka procentowego organicznego modyfikatora w fazie ruchomej (%C). Przeprowadzona analiza, po ekstrapolacji wyników do zerowego stężenia organicznego modyfikatora w fazie ruchomej, zgodnie z zależnością wyrażoną równaniem Soczewińskiego-Wachtmeistera $R_M = R_{M0} + aC$ [45], pozwoliła wyznaczyć wartości R_{M0} , które stanowią parametr lipofilowości wyznaczany techniką RP-TLC. Liniowa zależność między otrzymanymi wartościami R_{M0} , a parametrem 'a' wyznaczona dla poszczególnych faz ruchomych odgrywa ważną rolę w chromatograficznym badaniu lipofilowości. Dobra korelacja, wyznaczona eksperymentalnie sugeruje, że mechanizm retencji dla badanej grupy związków jest podobny. Obliczone wartości R_M malały liniowo ze wzrostem zawartości organicznego modyfikatora w fazie ruchomej. Wyznaczone parametry statystyczne wraz ze współczynnikami korelacji o wartościach bliskich 0,99 wskazują, że zależności są istotne statystycznie. Wartości R_{M0} są różne dla badanych związków, co może wynikać ze struktury chemicznej substancji. Dla oksykamów wartości R_{M0} mieściły się w zakresie 0,0011 do 1,7032, podczas gdy dla koksyków zawsze były to wartości wyższe, w zakresie od 1,0325 do 4,1971. Wyższe R_{M0} wskazują większą lipofilowość związku. Najniższe wartości R_{M0} otrzymano dla tenoksykamu i izoksykamu, związków które

40. R. Kaliszan, Quantitative structure-retention relationships (QSAR) in chromatography, rozdz. a: I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, i inni, Encyclopedia of separation science Vol. 9, Academic Press, San Diego

41. K. Dross, C. Sonntag, R. Mannhold, J. Chromatogr. A, 673, 113-124, 1994

42. A. Nasal, D. Siluk, R. Kaliszan, Curr. Med. Chem., 10, 381-426, 2003

43. Z. Grodzińska-Zachwieja, J. Bojarski, Farm. Pol., 37, 9-18, 1981

44. G. L. Biagi, A. M. Barbaro, A. Sapone, J. Chromatogr. A, 662, 341-361, 1994

45. E. Soczewiński, C.A. Wachtmeister, J. Chromatogr. 7, 311-320, 1962

które w odróżnieniu od koksylów nie posiadają grupy benzotiazynowej oraz mają mniej atomów węgla w cząsteczce.

Otrzymane wartości R_{M0} w układzie woda – metanol były wyższe niż w innych fazach ruchomych. W warunkach faz ruchomych z dodatkiem 1,4-dioksanu oraz acetonitrylu wartości R_{M0} były wyższe niż dla faz z acetonem i 2-propanolem. Zaistniałe różnice mogą być związane z lepszą rozpuszczalnością związków w tych modyfikatorach. Wyznaczone eksperymentalnie parametry lipofilowości wskazują, że tenoksykam i izoksykam cechuje najmniejsza lipofilowość, w przeciwieństwie do celekoksybu i waldekoksybu, które wykazują największe właściwości lipofilowe. Analiza zależności wartości R_{M0} dla każdych dwóch organicznych modyfikatorów wykazała wysokie wartości współczynników korelacji ($r > 0,94$), wskazując na istotny wpływ użytego modyfikatora na retencję substancji. Wartości parametru lipofilowości zależą od warunków eksperymentalnych i mogą być wynikiem specyficznych interakcji jakie zachodzą podczas rozdzielania i zależą od rodzaju modyfikatora oraz oddziaływań zachodzących pomiędzy modyfikatorem i fazą stacjonarną.

Z uwagi na istniejące różnice pomiędzy wyznaczonymi wartościami R_{M0} dla poszczególnych organicznych modyfikatorów przeanalizowano parametry retencji metodą Analizy Głównych Składowych (PCA; Principal Component Analysis) [46]. Otrzymane zależności wskazują na dużą zgodność wyników (wysokie parametry korelacji) otrzymanych eksperymentalnie. Analiza głównej składowej PC2 wskazuje, że część związków tj. waldekoksyb i rofekoksyb, osiągają znacząco wysokie wartości PC2 w przypadku zastosowania metanolu i acetonitrylu jako modyfikatora, a niskie – w układach z użyciem 1,4-dioksanu. Zachowanie to można tłumaczyć obecnością pięciocząłowego pierścienia zawierającego atom tlenu w cząsteczce związku. Odmienne zachowanie zaobserwowano dla cząsteczki celekoksybu, zawierającej atomy azotu w pierścieniu. Dalsza analiza, bazująca na grupowaniu danych według podobieństw (dendrogram), wykazała obecność wyraźnie oddzielonych dwóch grup związków (oksykamów i koksylów). Po uwzględnieniu zastosowanych do analizy organicznych modyfikatorów można stwierdzić odmienne zachowania dla 1,4-dioksanu (wysokie parametry retencji obniżające wartości PC2). Parametry retencji otrzymane dla acetonitrylu i 2-propanolu nie miały zasadniczo wpływu na wyniki PC2, podczas gdy w układach z metanolem ten wpływ był dodatni.

Powszechnie dostępne bazy informacji o substancjach leczniczych podają m.in. wartości $\log P$ wyznaczone jedną z wielu metod obliczeniowych. Zasadniczo metody te opierają się na teoretycznej fragmentacji cząsteczki związku chemicznego na mniejsze elementy, dla których znane są wartości $\log P$. Po zsumowaniu tych danych i przeprowadzeniu korelacji uwzględniających międzycząsteczkowe oddziaływania otrzymuje się wartości $\log P$ dla cząsteczki związku, teoretycznie mające odzwierciedlać jej lipofilowy charakter. Często tak uzyskane dane dla konkretnej substancji przy zastosowaniu różnych programów obliczeniowych są znacząco różne i praktycznie nie nadają się do zastosowania w ocenie lipofilowości. Szczególnie widoczne jest to dla związków o dużej masie cząsteczkowej

lub występujących w różnych formach np. izomerycznych czy konformacyjnych [47, 48]. W kolejnym etapie pracy porównano otrzymane eksperymentalnie wartości R_{M0} z wartościami $\log P_{ref}$ obliczonymi z zastosowaniem różnych algorytmów matematycznych [49]. Wykreślono zależności $R_{M0} = a \log P_{ref} + b$, uzyskując dobrą korelację ($r > 0,8$). Wartości R_{M0} są niższe od $\log P_{ref}$ dla oksykamów, a zbliżone dla koksylów. Najlepszą zgodność wyników uzyskano dla faz ruchomych zawierających metanol i aceton jako organiczny modyfikator. Jednakże korelacja wyników nie zawsze była zadowalająca, zwłaszcza dla programu XlogP3, gdzie współczynnik korelacji był bliski 0,2.

Na podstawie otrzymanych wyników oraz wyznaczonych zależności można stwierdzić, że do określenia lipofilowości związku chemicznego dobrym wyborem jest technika TLC w odwróconym układzie faz. Wyznaczone eksperymentalnie parametry lepiej oddają prawdziwe właściwości fizykochemiczne badanych związków niż algorytmy matematyczne. Pomimo, że dane otrzymane w trakcie rozdzielania chromatograficznego nie wyjaśniają wszystkich międzycząsteczkowych oddziaływań mających znaczenie w badaniu aktywności biologicznej substancji, to na pewno mogą stanowić dobre narzędzie do analizy, zwłaszcza w przypadku związków będących we wstępnej fazie badania jako potencjalnych leków. Dzięki postępowi w zakresie projektowania komputerowego, dotychczasowe osiągnięcia mogą być wykorzystane w zupełnie innym wymiarze, tzn. pozwalają nie tylko na zdefiniowanie, ale i analizę czynników wpływających na aktywność związków [50, 51].

3.4. Podsumowanie wyników badań

Moje zainteresowania związane są z analityką jakości związków chemicznych będących substancjami leczniczymi, a jako chemika-analityka, z zastosowaniem techniki chromatograficznej do identyfikacji, określania zawartości oraz badań nad trwałością produktów leczniczych. W niniejszym autoreferacie postanowiłam wyodrębnić ze swojego dorobku naukowego grupę prac dotyczących badań substancji biologicznie aktywnych z grupy niesteroidowych leków przeciwzapalnych [H1-H11]. Przetworzony cykl publikacji stanowi analizę dotychczasowych i opracowanie nowych metod identyfikacji i oznaczania ilościowego oksykamów i koksylów z uwzględnieniem problemu ich trwałości w zmiennych warunkach środowiska. Wykorzystując technikę TLC przeprowadziłam optymalizację układów chromatograficznych pod względem uzyskania optymalnej retencji, selektywności rozdzielania i sprawności układów. Opracowałam warunki przydatne do analizy związków

47. I. Kos, J.S. Reboucas, G. DelFreitas-Silva, D. Salvemini, Z. Vujaskovic, M.W. Dewhirst, I. Spasojevic, I. Batinic-Haberle, Free Radic. Biol. Med., 47, 72-78, 2009

48. M.A. Anwair, L. Karolyhazy, D. Szabo, B. Balogh, I. Kovacs, J. Krenyacz, A. Gellert, K. Takacs-Novak, P. Matyus, J. Agric. Food Chem., 51, 5262-5270, 2003

49. www.drugbank.ca; <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>; www.chemaxon.com; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>; www.terrabase-inc.com; www.acdlabs.com

50. J.A. Arnott, S.L. Planey, Expert Opin. Drug Discov., 7, 863-875, 2012

51. N. Gulyaeva, A. Zaslavsky, P. Lechner, M. Chlenov, O. McConnell, A. Chait, V. Kipnis, B. Zaslavsky, Eur. J. Med. Chem., 38, 391-396, 2003

w różnych matrycach, uzyskując dobry rozdział składników oraz symetryczne piki na densytogramach. Zaproponowałam metody ilościowego oznaczania piroksykanu, meloksykanu, tenoksykanu, izoksykanu, celekoksybu, etorykoksybu, rofekoksybu i waldekoksybu w lekach, krwi i moczu. Opracowane metody spełniają kryteria specyficzności, liniowości, precyzji i dokładności, zgodnie z wymaganiami ICH, co warunkuje ich przydatność w analizie substancji i produktów leczniczych. Do identyfikacji substancji wykorzystałam wartości R_F i widma absorpcji uzyskane dla substancji wzorcowych i składników badanych próbek. Ponadto zbadałam wpływ rodzaju i stężenia organicznego modyfikatora (metanol, aceton, acetonitryl, 1,4-dioksan, 2-propanol) na sprawność i selektywność układów chromatograficznych dla analizowanej grupy związków. Mając na uwadze istotność lipofilowości w przewidywaniu aktywności biologicznej oraz dysponując wyznaczonymi eksperymentalnie parametrami retencji ($\log P \equiv R_{M0}$), sprawdziłam możliwość klasyfikacji związków w ujęciu aktywności i budowy chemicznej. Reasumując, wykonane badania pozwoliły na opracowanie uniwersalnych metod, które mogą być przydatne w analizie ilościowej i kontroli jakości związków chemicznych. Wskazałam także prawdopodobne drogi degradacji związków, co może być pomocne w ocenie jakości preparatów farmaceutycznych. Metodyka wykorzystana w badaniach oparta na technice separacji połączonej z densytometrią ma charakter aplikacyjny, może być łatwo zaadaptowana przez inne ośrodki naukowo – badawcze oraz laboratoria przemysłowe do badań analitycznych. Prostota przedstawionych metod i ich stosunkowo niski koszt przy zachowaniu wysokiej efektywności umożliwia ich wykorzystanie do rutynowych badań związanych z potwierdzeniem tożsamości, oznaczeniem zawartości i oceną trwałości leków.

Na podstawie otrzymanych wyników można sformułować następujące wnioski:

- opracowane, zoptymalizowane i zwalidowane procedury chromatograficznej analizy pozwalają na jednoczesne wykonanie badania tożsamości, czystości i zawartości substancji czynnych obok ewentualnych zanieczyszczeń w wybranych lekach o działaniu przeciwbólowym i przeciwzapalnym,
- eksperymentalnie wyznaczone wartości parametrów kinetycznych i termodynamicznych pomagają określić trwałość związku pod wpływem badanych czynników (pH, temperatura, czas inkubacji), które mogą inicjować procesy degradacji, prowadzące w efekcie do chemicznej przemiany związku w kierunku pozbawienia go aktywności farmakologicznej, co może skutkować bezskuteczną terapią lub wywoływaniem działań niepożądanych,
- określenie korelacji pomiędzy wyznaczonymi doświadczalnie parametrami R_{M0} , a dostępnymi w bazach danych wartościami $\log P$ co pozwala na ocenę właściwości fizykochemicznych substancji,
- uzyskane w oparciu o opracowane procedury analityczne wyniki mogą w szybki i dokładny sposób pomóc w określeniu podatności leków na rozkład, co może mieć znaczenie zarówno przy produkcji postaci leku, jak i przy określeniu skuteczności działania i bezpieczeństwa jego stosowania.

Podsumowując mogę stwierdzić, że do najważniejszych osiągnięć i elementów nowości naukowej wynikających z przeprowadzonych badań zaliczam:

1. opracowanie nowych metod analitycznych dedykowanych do analizy wybranych oksykamów i koksylów w zróżnicowanej matrycy (produkty lecznicze, matryce biologiczne),
2. przeprowadzenie walidacji opracowanych procedur chromatograficznych,
3. wykazanie, że opracowane metody identyfikacji i oznaczania ilościowego wyróżniają się specyficznością, mogą więc posiadać walory aplikacyjne jako metody alternatywne dla rekomendowanych przez Farmakopee lub jako ich uzupełnienie (wstępne metody skriningowe),
4. obliczenie parametrów kinetycznych i termodynamicznych reakcji degradacji wybranych substancji oraz wykazanie, że na szybkość degradacji mają wpływ zarówno pH roztworów, jaki i temperatura i czas inkubacji,
5. ustalenie metodą spektrometrii mas i ^1H NMR struktury produktów degradacji i zaproponowanie kierunku zachodzących przemian,
6. wykazanie, że opracowane procedury umożliwiają badania związków o podobnej strukturze chemicznej, zbliżonej masie cząsteczkowej i właściwościach fizykochemicznych,
7. wykazanie przydatności opracowanych metod do usprawnienia procedur stosowanych w rutynowych badaniach, związanych z potwierdzeniem tożsamości i oznaczeniem zawartości oraz oceną trwałości leków.

4. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

Od początku pracy zawodowej jestem aktywnie zaangażowana w badania naukowe. Wyniki badań z moim udziałem zostały opublikowane w czasopismach naukowych oraz były prezentowane na krajowych i międzynarodowych konferencjach naukowych. Moje zainteresowania od początku zaliczyć można do obszaru związanego z zastosowaniem metod analitycznych w kontroli jakości, a konkretnie praktycznego zastosowania metod chromatografii cienkowarstwowej do identyfikacji i oznaczania ilościowego substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych oraz suplementach diety, obok składników współobecnych oraz ewentualnych produktów degradacji.

Obecnie wyróżnić mogę dwa kierunki moich badań:

- główny: badania właściwości fizykochemicznych substancji leczniczych metodami chromatograficznymi oraz badania trwałości tych związków pod wpływem różnych czynników zewnętrznych;
- dodatkowy: zastosowanie technik analitycznych w badaniach materiału biologicznego.

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Swoje naukowe zainteresowania farmaceutycznymi aspektami chemii rozpoczęłam w roku 1993, ale zainteresowania naukami ścisłymi rozwijałam od najmłodszych lat. Po ukończeniu V Liceum Ogólnokształcącego w Krakowie (profil matematyczno-fizyczny) podjęłam studia na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego, gdzie poza poszerzaniem wiedzy z dziedziny chemii zapoznawałam się z aspektami technologicznymi, informatycznymi oraz dydaktycznymi, co stało się dla mnie źródłem cennych doświadczeń wykorzystywanych obecnie w pracy naukowo-dydaktycznej. Praca magisterska pt „Opracowanie zestawu folio i fazogramów wraz z przewodnikiem metodycznym do nauczania wybranych zagadnień z chemii organicznej. Część I” napisana pod opieką dr Michała Poźniczka i kierunkiem naukowym prof. dr hab. Janusza Jamrozika prezentowała zestaw materiałów dydaktycznych do realizacji programu nauczania chemii organicznej w szkołach ponadpodstawowych. Po obronie pracy magisterskiej rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie, gdzie oprócz pracy dydaktycznej podjęłam prace badawcze z zakresu chemii analitycznej.

W początkowym okresie pracy przedmiotem moich badań była analiza związków biologicznie aktywnych w preparatach farmaceutycznych pod kierunkiem prof. dr hab. Włodzimierza Rzeszutko. Ponadto uczestniczyłam w opracowywaniu zestawów zadań oraz nowoczesnych możliwości prezentacji wyników. Później moje zainteresowanie wzbudziły prace naukowe prof. dr hab. Jana Krzeka, ówczesnego Kierownika Zakładu Chemii Nieorganicznej i Laboratorium Kontroli Jakości Leków w Krakowie. Nawiązana współpraca zaowocowała podjęciem zupełnie nowego tematu badawczego pod kierunkiem Profesora, której efektem była rozprawa doktorska pt „Densytometryczna ocena jakości wybranych leków przeciwbólowych”.

Głównymi obszarami moich zainteresowań badawczych prowadzonych przed doktoratem były poszukiwania optymalnych warunków do oznaczania substancji aktywnych (NLPZ, antybiotyki) w produktach farmaceutycznych metodami chromatograficznymi. Prace dotyczyły opracowania nowych metod analitycznych oraz prób identyfikacji ewentualnych zanieczyszczeń. Efektem moich badań prowadzonych w latach 1993-2003 są wyniki prezentowane w formie artykułów naukowych oraz prezentacji na konferencjach. Część badań została opublikowana przed obroną pracy doktorskiej, a część zaprezentowana w rozprawie doktorskiej.

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych podczas wykonywania doktoratu należy:

- opracowanie warunków jednoczesnej identyfikacji i oznaczania ilościowego wybranych składników czynnych i ich zanieczyszczeń metodą chromatograficzno – densytometryczną;
- zbadanie stabilności wybranych leków zawierających w składzie diklofenak, indometacynę, naproksen i tramadol.

Opublikowane w czasopismach naukowych prace badawcze dotyczyły:

1. Krzek J., Starek M., Kwiecień A., Simultaneous determination of guaiaamar carbamate and acetylsalicylic acid by a chromatographic – densitometric method, *Acta Pol. Pharm.*, 55, 429-434, 1998
IF = — **MNiSW** — pkt

2. Krzek J., Starek M., The effect of acetylsalicylic acid on the stability of methocarbamol in complex drugs, *Acta Pol. Pharm.*, 56, 369-374, 1999

IF = — **MNiSW** 4 pkt

3. Krzek J., Starek M., Densitometric determination of active constituents and impurities in complex analgesic and antipyretic pharmaceuticals, *JPC–J. Planar Chromatogr.*, 12, 356-360, 1999

IF = 1,030 **MNiSW** 9 pkt

4. Krzek J., Starek M., Kwiecień A., Jednoczesne oznaczanie chlorowodoru oksytetracykliny i wodorofumaranu tiamuliny metodą potencjometryczną, *Biul. Inst. Lek.*, 44, 421-425, 2000

IF = — **MNiSW** 1 pkt

5. Krzek J., Kwiecień A., Starek M., Kierszniewska A., Rzeszutko W., Identification and determination of oxytetracycline, tiamulin, lincomycin and spectinomycin in veterinary preparations by thin layer chromatography and densitometry, *J. AOAC Int.*, 83, 1502-1506, 2000

IF = 1,066 **MNiSW** 9 pkt

6. Krzek J., Starek M., Kwiecień A., Rzeszutko W., Simultaneous identification and quantitative determination of neomycin sulfate, polymixin B sulfate, zinc bacitracin and methyl and propyl hydroxybenzoates in ophthalmic ointment by TLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24, 629-636, 2001

IF = 1,177 **MNiSW** 9 pkt

7. Krzek J., Starek M. „Simultaneous densitometric determination of indomethacin and its degradation products, 4-chlorobenzoic acid and 5-methoxy-2-methyl-3-indoleacetic acid in pharmaceutical preparations” *J. AOAC Int.*, 84, 1703-1707, 2001

IF = 1,330 **MNiSW** 9 pkt

8. Krzek J., Starek M., Stożek T., Ocena stabilności kwasu acetylosalicylowego w tabletkach, *Farm. Pol.*, 21, 974-978, 2001

IF = — **MNiSW** 2 pkt

9. Krzek J., Starek M., Densitometric determination of diclofenac, 1-(2,6-dichlorophenyl)indolin-2-on and indolin-2-one in pharmaceutical preparations and model solutions, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 28, 227-243, 2002

IF = 1,360 **MNiSW** 9 pkt

4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Prace doktorską obroniłam w 2003 roku na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum. Promotorem rozprawy był prof. dr hab. Jan Krzek, a recenzentami prof. dr hab. Marianna Zając oraz prof. dr hab. Alfred Zejc. Na podstawie rozprawy doktorskiej opublikowałam kolejne prace dotyczące analizy naproksenu i tramadolu.

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych zainteresowania badawcze skoncentrowałam na optymalizacji metod chromatograficznych do analizy substancji biologicznie aktywnych w produktach leczniczych. Opracowałam warunki rozdzielania ibuprofenu, oksaprozinu, nefopamu oraz nabumetonu, a także zbadałam kinetykę reakcji hydrolizy tych związków w różnych warunkach środowiska. Ponadto zastosowałam chromatografię cienkowarstwową do oznaczeń składników aktywnych w suplementach diety (L-karnityna, β -karoten, β -sitosterol).

Jednakże głównym nurtem mojego zainteresowania są niesteroidowe leki przeciwzapalne, zwłaszcza związki z grupy oksykamów i koksybów, które analizowałam w aspekcie ich właściwości fizykochemicznych. Wyniki tych badań przedstawiłam w cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego [H1-H11]. Obecnie moje badania prowadzone są w dwóch zasadniczych kierunkach: optymalizacji procedur analitycznych do potwierdzenia tożsamości i oznaczania ilościowego substancji czynnych w preparatach farmaceutycznych, oraz zastosowania opracowanych metod do badania właściwości fizykochemicznych związków poprzez analizę wpływu czynników zewnętrznych na retencję i stabilność badanych substancji.

Opracowałam także kilka prac poglądowych dotyczących wykorzystania różnych technik analitycznych w badaniach wybranych substancji czynnych z grupy NLPZ i antybiotyków. Konfrontacja uzyskanych przeze mnie wyników z danymi literaturowymi sugeruje, że technika TLC z densytometrią stanowią uniwersalne narzędzie w rozwiązywaniu różnorodnych problemów analitycznych.

Badania po doktoracie opublikowane w czasopismach naukowych dotyczyły:

1. Krzek J., Starek M., Densitometric determination of naproxen and of naproxen methyl ester, its impurity, in pharmaceutical preparations, JPC–J. Planar Chromatogr., 17, 137-142, 2004
IF₂₀₀₄ = 0,824 MNiSW 8 pkt

2. Krzek J., Starek M., Quality assessment for tramadol in pharmaceutical preparations with thin layer chromatography and densitometry, Biomed. Chromatogr., 18, 589-599, 2004
IF₂₀₀₄ = 1,069 MNiSW 9 pkt

3. Krzek J., Starek M., Jelonkiewicz D., RP-TLC determination of S(+) and R(-) Ibuprofen in drug with the application of chiral mobile phase and UV densitometric detection, Chromatographia, 62 (11/12), 653-657, 2005
IF₂₀₀₅ = 0,959 MNiSW 15 pkt

4. Starek M., Krzek M., Michnik S., TLC-densitometric analysis of β -sitosterol in pumpkin seed oil, JPC–J. Planar Chromatogr.–Modern TLC, 20, 327-330, 2007

IF₂₀₀₇ = 0,683 MNiSW 10 pkt

5. Starek M., Krzek J., Stoch M., Densitometric analysis of 2-arylpropionate derivatives in pharmaceutical preparations, JPC–J. Planar Chromatogr.–Modern TLC, 21, 251-258, 2008

IF₂₀₀₈ = 0,982 MNiSW 15 pkt

6. Starek M., Dąbrowska M., Skuciński J., Thin-layer chromatography methods for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and cephalosporin antibiotics: A review, Rec. Pat. Chem. Eng., 3, 49-73, 2010

IF₂₀₁₀ = — MNiSW 2 pkt

7. Starek M., Krzek J., Tarsa M., TLC-densitometric method for quantitation of oxaprozin and degradation products in pharmaceutical preparations, JPC–J. Planar Chromatogr.–Modern TLC, 23, 298-303, 2010

IF₂₀₁₀ = 1,247 MNiSW 20 pkt

8. Starek M., Krzek J., TLC chromatographic-densitometric assay of ibuprofen and its impurities, J. Chromatogr. Sci., 48, 825-829, 2010

IF₂₀₁₀ = 1,087 MNiSW 20 pkt

9. Dąbrowska M., Starek M., Simultaneous identification and quantitative determination of eight cephalosporins in pharmaceutical formulations by TLC-densitometry, JPC–J. Planar Chromatogr., 24, 23-29, 2011

IF₂₀₁₁ = 0,767 MNiSW 20 pkt

10. Starek M., Dąbrowska M., Tarsa M., Analysis of nefopam by TLC-densitometry. A study of degradation mechanism in solutions under stress conditions, Acta Chim. Slov., 58, 262-269, 2011

IF₂₀₁₁ = 1,328 MNiSW 25 pkt

11. Starek M., Łaskawski Sz., Dąbrowska M., Identification and quantitative determination of nabumetone in pharmaceutical preparations by TLC-densitometry, JPC–J. Planar Chromatogr., 6, 513-519, 2011

IF₂₀₁₁ = 0,767 MNiSW 20 pkt

12. Dąbrowska M., Starek M., Skuciński J., Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review, Talanta, 86, 35-51, 2011

IF₂₀₁₁ = 3,794 MNiSW 40 pkt

13. Skuciński J., Dąbrowska M., Wieczorek J., Starek M., Szura M., What about transplantations in future – allotransplantation or xenotransplantation?, MIR (Med. Inter. Rev.), 3, 71-85, 2011

IF₂₀₁₁ = — MNiSW — pkt

14. Starek M., Krzek. J., Chemical study of (+)-(S)-ibuprofen enantiomer chiral inversion, JPC–J. Planar Chromatogr.–Modern TLC, 25, 19-22, 2012

IF₂₀₁₂ = 0,955 **MNiSW** 20 pkt

15. Starek M., Dąbrowska M., Development and validation of a TLC-densitometry method for quantitative analysis of nefopam hydrochloride beside its degradation products, J. Anal. Chem., 67, 733-739, 2012

IF₂₀₁₂ = 0,616 **MNiSW** 15 pkt

16. Starek M., Dąbrowska M., Chromatographic techniques in analysis of COX-2 inhibitors in drugs and biological samples, Cent. Eur. J. Chem., 10, 711-730, 2012

IF₂₀₁₂ = 1,167 **MNiSW** 25 pkt

17. Dąbrowska M., Sieczka E., Starek M., TLC assay of L-carnitine in dietary supplements, JPC– J. Planar Chromatogr.–Modern TLC, 5, 45-455, 2012

IF₂₀₁₂ = 0,955 **MNiSW** 20 pkt

18. Dąbrowska M., Starek M., Analytical approaches to determination of carnitine in biological material, foods and dietary supplements, Food Chem., 142, 220-232, 2014

IF₂₀₁₃ = 3,259 **MNiSW** 40 pkt

19. Dąbrowska M., Starek M., Krzek J., Papp E., Król P., A degradation study of cefepime hydrochloride in solutions under various stress conditions by TLC-densitometry, Biomed. Chromatogr., 29, 388-395, 2015

IF₂₀₁₃ = 1,662 **MNiSW** 20 pkt

20. Skuciński J., Dąbrowska M., Starek M., Szura M., Wieczorek J., Smorąg Z., Application of analytical techniques to monitoring of kidney viability before transplantation during storage in ViaSpan® and Biolasol® Plus preservation solutions, Anal. Meth., 6, 9093-9100, 2014

IF₂₀₁₃ = 1,938 **MNiSW** 25 pkt

21. Starek M., Guja A., Dąbrowska M., Krzek J., 2015, Assay of β -carotene in dietary supplements and fruit juices by TLC-densitometry, Food Anal. Meth., DOI 10.1007/s12161-014-0019-0

IF₂₀₁₃ = 1,802 **MNiSW** 25 pkt

Aktualnie kontynuuję badania obejmujące ocenę jakości substancji leczniczych oraz określenie ich właściwości fizykochemicznych z zastosowaniem technik chromatograficznych. Wyniki badań dotyczących wybranych oksykamów i koksylów pod wpływem promieniowania UV oraz w obecności jonów metali i czynników utleniających, a także analiza parametrów retencji związków w układach chromatograficznych z zastosowaniem faz stacjonarnych o różnych właściwościach, będą przedmiotem kolejnych artykułów, przygotowywanych do publikacji w czasopismach naukowych.

W toku dotychczasowej pracy badawczej poza substancjami należącymi do NLPZ analizowałam także antybiotyki w różnych postaciach farmaceutycznych. Badania te dotyczyły zarówno oznaczania składników obok siebie (oksytetracyklina, tiamulina, linkomycyna, spektinomycyna; neomycyna, polimyksyna, bacytracyna; cefalosporyny) jak i analizy ewentualnych zanieczyszczeń i produktów rozkładu.

Poza artykułami opublikowanymi w krajowych i międzynarodowych czasopismach naukowych na przedstawione tematy, jestem współautorem 4 rozdziałów w wydawnictwach książkowych krajowych i zagranicznych (**Załącznik 3, II-E**).

4.3 Inne formy działalności naukowo-badawczej

W okresie mojego zatrudnienia w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej UJ CM brałam udział łącznie w 10 projektach badawczych obejmujących programy badań własnych i statutowych, a także projekt naukowo-badawczy Nr N R12 0036 06/13/2009 DOP-D/141/09, w których pełniłam funkcje wykonawcy lub kierownika (**Załącznik 3, II-I**).

Poza zagadnieniami z dziedziny analityki farmaceutycznej moje zainteresowania od 2008 roku skierowały się także ku biologii molekularnej i możliwości wykorzystania metod analitycznych w badaniach materiału biologicznego. Działalność naukowa umożliwiła mi podjęcie współpracy z badaczami, czasem o zupełnie odmiennej specjalności i podjęcie pracy w zespole do realizacji konkretnych zamierzeń (**Załącznik 3, II-I.1**). Wspólnie z Instytutem Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach oraz Wydziałem Lekarskim i Wydziałem Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum uczestniczyłam jako wykonawca w projekcie naukowo-badawczym Nr N R12 03606/13/2009 DOP-D/141/09. Grant obejmował realizację zadania w ramach projektu rozwojowego pt. „Uzyskanie transgeniczných świń jako dawców tkanek i narządów do transplantacji u ludzi oraz ich biotechnologiczna, fizjologiczna i medyczna charakterystyka”.

Przeprowadzone badania dotyczyły zastosowania różnych technik analitycznych pozwalających wskazać odmienne drogi śmierci komórki oraz określić poziom apoptozy, co może mieć wpływ na wybór strategii terapeutycznej [52]. Jednym z istotnych aspektów technicznych we wstępnych badaniach przedklinicznych dotyczących możliwości wykorzystania narządów jest ocena ich przydatności do przeszczepienia [53]. Obejmuje ona szereg czynników, m.in. określenie optymalnych warunków do przechowywania pobranych narządów w zależności od czasu oraz stosowanych płynów konserwujących. W celu oceny funkcjonalności przechowywanych nerek wykonano pomiary zawartości ATP, obecnego we wszystkich metabolicznie czynnych komórkach, metodą bioluminescencyjną. Metodą konwencjonalnej elektroforezy w żelu agarozowym sprawdzono stopień fragmentacji DNA, co pozwala określić jakość badanego materiału. Fluorymetrycznie oznaczono także aktywność kaspazy-3, specyficznego markera procesu apoptozy.

52. J.F. Kerr, A.H. Wyllie, A.R. Currie, Br. J. Cancer, 26, 239-257, 1972

53. L. Cierpka, *Historia transplantacji. Biotechnologiczne i medyczne podstawy ksenotransplantacji*, PAN, Poznań, 2006

Wyniki badań naszego zespołu zostały zaprezentowane w postaci: posterów prezentowanych na konferencjach naukowych (**Załącznik 3, III-B**), rozdziałów w książkach (**Załącznik 3, II-E**), a także artykułów w czasopismach naukowych (**Załącznik 3, II-A,E, III-B**).

W trakcie mojej pracy we współpracy z firmą Chema-Elektromet, Sp. Pracy w Rzeszowie wykonałam badania tożsamości i zawartości substancji czynnych i środków konserwujących w maści Multibiotic. Przeprowadzone badania zaowocowały publikacją w czasopiśmie naukowym przedstawiającą zwalidowaną metodę analityczną do oznaczania składników w preparacie farmaceutycznym (**Załącznik 3, II-A**).

Wyniki wszystkich dotychczasowych moich badań prezentowałam na 42 zjazdach, konferencjach i seminariach naukowych, zarówno krajowych jak i międzynarodowych. Poza oryginalnym dorobkiem naukowo-badawczym jestem autorką 28 recenzji prac naukowych dla czasopism międzynarodowych i krajowych, zarówno ze wskaźnikiem IF jak i bez IF (**Załącznik 3, III-P**). Ponadto jestem Członkiem Rady Doradczej czasopisma „Recent Patents on Chemical Engineering” (**Załącznik 3, III-G**).

W czasie pracy zawodowej staram się ciągle poszerzać swoją wiedzę oraz umiejętności zarówno na studiach podyplomowych (Biologia Molekularna) jak i kursach doskonalących (Kurs Nowoczesnej Chromatografii Cieczowej; Kurs Alkoholologia sądowa i narkomania) (**Załącznik 3, III-Q**).

5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I ORGANIZACYJNA

Od chwili zatrudnienia w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w roku 1993 czynnie uczestniczę w zajęciach dydaktycznych. Do mojej aktywności w dziedzinie dydaktyki należy zaliczyć przede wszystkim realizację zajęć laboratoryjnych z chemii ogólnej, nieorganicznej i analitycznej, obejmujących analizę jakościową soli, potwierdzanie tożsamości jonów, analizę związków trudnorozpuszczalnych oraz badania czystości związków metodami farmakopealnymi, a także analizę ilościową prowadzoną zarówno metodami klasycznymi tj. analiza wagowa i miareczkowa, jak i technikami instrumentalnymi. Zajęcia z w/w tematyki prowadzę ze studentami farmacji, analityki medycznej oraz kosmetologii. Prowadzę również seminaria obliczeniowe dla studentów I roku Wydziału Farmaceutycznego obejmujące zakres chemii ogólnej, a także z metod instrumentalnych dla studentów II roku Wydziału Farmaceutycznego z zakresu wybranych metod analitycznych, stanowiące rozszerzenie wiedzy prezentowanej na wykładzie i ćwiczeniach.

Brałam udział w tworzeniu i opracowywaniu ćwiczeń praktycznych z analizy miareczkowej oraz spektrofotometrii i chromatografii, konspektów do seminariów z obliczeń chemicznych (przeliczanie stężeń, roztwory buforowe, reakcje utleniania i redukcji, rozpuszczalność

i iloczyn rozpuszczalności, związki kompleksowe) oraz seminariów z zakresu chromatografii i spektrometrii.

Do moich obowiązków należy opieka nad studentami pierwszego roku farmacji, a także opieka nad pracami magisterskimi prowadzonymi w Katedrze z zakresu chemii analitycznej. Moim celem jest, aby każda z prac magisterskich wykonywanych pod moją opieką miała obiektywny walor naukowy i mogła stanowić podstawę do powstania wartościowych artykułów naukowych (Załącznik 3, III-J).

W swojej działalności dydaktycznej staram się stale unowocześniać treści i formy. W związku z tym podejmuję uczestnictwo w różnych kursach i szkoleniach popularyzatorskich oraz doskonalących zawodowo (Załącznik 3, III-Q).

Działalność dydaktyczna obejmuje również swym zakresem sferę popularyzatorską wybiegającą poza aktywność uczelnianą. Jako osiągnięcia dydaktyczne w zakresie popularyzacji nauki mogę wymienić udział w promocji Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w ramach Festiwalu Nauki oraz Targów Edukacyjnych w Krakowie. Uczestniczyłam także w spotkaniach organizowanych przez PAU oraz CITTRU. Ponadto należę do Bazy Ekspertów Polsko-Norweskiego Funduszu Badań Naukowych, gdzie służę pomocą w procesie merytorycznej oceny projektów badawczych (Załącznik 3, III-I,N).

W ramach działalności organizacyjnej na rzecz macierzystej uczelni w roku 2004 i 2005 byłam członkiem Komisji Egzaminacyjnej na Wydziale Farmaceutycznym UJ CM.

Jako członek komitetu organizacyjnego brałam udział w organizacji zarówno krajowych jak i międzynarodowych konferencji naukowych (Załącznik 3, III-C).

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego oraz Polskiego Towarzystwa Magnezologicznego (Załącznik 3, III-H).

Ukończyłam kurs Europejskiej Rady Resuscytacji BLS/AED i w związku z powyższym od 2010 jestem jedną z osób odpowiedzialnych za udzielanie pierwszej pomocy w Katedrze (Załącznik 3, III-Q).

Brałam także udział w spotkaniach dotyczących polepszania organizacji pracy:

- I Seminarium „Polskie Laboratoria w Europie XXI wieku” organizowane przez Laboratoryjny Serwis Informacyjny oraz Pełnomocnika Rektora UJ ds. Osób Niepełnosprawnych w Krakowie, 01.06.2005;
- spotkanie nt. „Programy oraz oferty stypendialne dla polskich naukowców z dziedziny nauk biologicznych i medycznych” organizowane przez CTPK w Krakowie, 12.06.2006;
- Seminarium nt. „Jak stworzyć nowoczesne laboratorium chemiczne? Od pomysłu do sukcesu”, KRAKÓW 13.04.2011.

Za osiągnięcia naukowe za rok 2009, 2011 oraz 2012 zostałam uhonorowana nagrodami przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM. Natomiast w 2013 roku Prezydent Rzeczypospolitej Polskiej przyznał mi Medal Brązowy za Długoletnią Służbę (Załącznik 3, II-D,J).

