

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



**UNIwersytet Jagielloński
COLLEGIUM MEDICUM
WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY**

KATEDRA CHEMII NIEORGANICZNEJ I ANALITYCZNEJ

**Analiza ilościowa oraz badanie właściwości fizykochemicznych
wybranych cefalosporyn wraz z oceną ich trwałości
w warunkach stresowych**

Monika Dąbrowska

KRAKÓW 2017

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 14.03.2003r. 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 będących podstawą habilitacji	4
3.2.	Prezentacja wyników badań	5
3.2.1.	Wprowadzenie	5
3.2.2.	Cel naukowo-badawczy	10
3.2.3.	Omówienie wyników stanowiących podstawę habilitacji	11
3.2.4.	Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji	32
4.	Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	37
4.1.	Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora	37
4.2.	Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora	39
5.	Działalność dydaktyczna i organizacyjna	42

1. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- 1998** Dyplom i stopień magistra analityki medycznej uzyskany na podstawie pracy magisterskiej pt. „Zagęszczanie i sporządzanie liniowych gradientów stężeń składników płynów biologicznych metodą zamrażania/rozmarzania” w Zakładzie Immunochemii Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, na Wydziale Farmaceutycznym z Oddziałem Analityki Medycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
- 2008** Dyplom i stopień doktora nauk farmaceutycznych w specjalności chemia analityczna uzyskany na podstawie rozprawy doktorskiej pt. „Analiza wybranych cefalosporyn z udziałem β -cyklodekstryny w aspekcie rozdziału izomerów i oceny trwałości” na Wydziale Farmaceutycznym Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie
- 2011** Dyplom ukończenia studiów podyplomowych w zakresie ‘Prawa Dowodowego’ prowadzonych na Wydziale Prawa i Administracji Uniwersytetu Jagiellońskiego i Instytucie Ekspertyz Sądowych 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 01.10.1999 – pracownik w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie.

Zajmowane stanowiska:

od 01.10.1999 do 01.10.2009 – asystent

od 01.10.2009 do chwili obecnej – adiunkt

3. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ HABILITACJI wynikające z Art. 16, ust. 2 ustawy z dnia 14.03.2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późn. zm., tekst jednolity Dz.U. 2017 poz. 1789)

Podstawę niniejszej habilitacji stanowi cykl 7 publikacji oryginalnych, powiązanych tematycznie, przedstawionych jako osiągnięcie naukowe w punkcie 3.1.[H1–H7] pt.:

Analiza ilościowa oraz badanie właściwości fizykochemicznych wybranych cefalosporyn wraz z oceną ich trwałości w warunkach stresowych

3.1. Wykaz publikacji będących podstawą habilitacji

Podstawę pracy habilitacyjnej stanowi cykl siedmiu opublikowanych prac o sumarycznym **IF** (*Impact Factor* wg Journal Citation Reports ICR) wynoszącym **13.235** (MNiSW 160 pkt).

We wszystkich pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

H1. Dąbrowska M., Starek M., Skuciński J., Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review, *Talanta*, 2011, 86, 35–51

IF₂₀₁₁ = 3.794 **MNiSW₂₀₁₁ = 40** pkt

H2. Dąbrowska M., Komsta Ł., Krzek J., Kokoszka K., Lipophilicity study of eight cephalosporins by reversed-phase thin-layer chromatographic method, *Biomedical Chromatography*, 2015, 29, 1759–1768

IF₂₀₁₅ = 1.729 **MNiSW₂₀₁₅ = 20** pkt.

H3. Dąbrowska M., Starek M., Komsta Ł., Szafranski P., Stasiewicz-Urban A., Opoka W., Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 101, 115–124

IF₂₀₁₆ = 3.756 **MNiSW₂₀₁₆ = 35** pkt

H4. 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, *Biomedical Chromatography*, 2015, 29, 388–395

IF₂₀₁₅ = 1.729 **MNiSW₂₀₁₅ = 20** pkt

H5. Dąbrowska M., Starek M., Opoka W., Comprehensive study of the stability of cefepime hydrochloride and cefuroxime axetil under various environmental conditions, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2016, 29, 264–272

IF₂₀₁₆ = 0.736 **MNiSW₂₀₁₆ = 15** pkt

H6. Dąbrowska M., Komsta Ł., Opoka W., Starek M., Chemometric analysis of chromatographic data in stability investigation of cephalosporins, *Acta Chromatographica*, DOI: 10.1556/1326.2017.00341

IF₂₀₁₆ = 0.755 **MNiSW₂₀₁₆ = 15** pkt

H7. Dąbrowska M., Starek M., Opoka W., Determination of cefuroxime axetil and cefepime in biological material by TLC–densitometry, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2017, 30, 291–298

IF₂₀₁₆ = 0.736 **MNiSW₂₀₁₆ = 15** pkt

W przypadku prac opublikowanych w 2017 roku, podano *Impact Factor* oraz punktację MNiSW za rok 2016. W dniu złożenia do Centralnej Komisji do Spraw Stopni i Tytułów wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, nie był dostępny *Impact Factor*, jak również punktacja MNiSW za rok 2017.

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

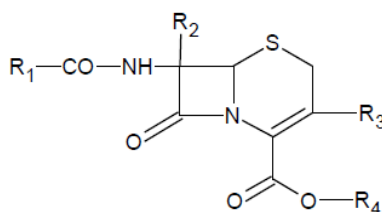
Badania HPLC-MS/MS [H4] wykonano w Zakładzie Farmakokinetyki i Farmacji Fizycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

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

3.2. Prezentacja wyników badań

3.2.1. Wprowadzenie

Cefalosporyny stanowią grupę półsyntetycznych antybiotyków β -laktamowych o szerokim spektrum działania bakteriobójczego. Mechanizm działania związany jest z hamowaniem ostatniego etapu syntezy ściany komórkowej bakterii poprzez wiązanie kowalencyjne z centrum aktywnym enzymu transpeptydazy, który jest odpowiedzialny za poprzeczne sieciowanie nici peptydoglikanów. Zablockowanie tego etapu prowadzi do zwiększenia przepuszczalności ściany komórkowej, zmniejszenia zdolności namnażania i w konsekwencji do lizy bakterii [1]. Cefalosporyny zbudowane są z czterocząłowego układu β -laktamowego skondensowanego z sześciocząłowym pierścieniem 1,3-dihydrotiazyny w odróżnieniu od penicylin, które zawierają pięciocząłowy pierścień tiazolidyny (Rys. 1).



Rysunek 1. Podstawowa struktura cefalosporyn (R oznacza dodatkowe łańcuchy boczne
Podstawienie w tych miejscach różnych grup chemicznych daje odmienne zakresy działania
antybiotyków, różne właściwości farmakokinetyczne)

Obecne w ich cząsteczkach wiązanie β -laktamowe jest trwalsze niż w penicylinach naturalnych, co wynika ze stabilizującego wpływu pierścienia 1,3-dihydrotiazynowego, jak również grupy podstawników w łańcuchu bocznym, które mogą osłaniać wiązanie laktamowe elektronowo i sterycznie. Tak skondensowany układ β -laktamowy z 1,3-dihydrotiazyną tworzy strukturę Δ -2-cefemu, która stanowi podstawowy element budowy cefalosporyn, warunkujący ich działanie [2]. Aktywność farmakologiczna Δ -2-cefemu i jego pochodnych wynika z lokalizacji podwójnego wiązania pomiędzy C_2 i C_3 w pierścieniu 1,3-dihydrotiazyny (piramidalne usytuowanie atomu azotu).

Występowanie podwójnego wiązania między atomami węgla w pierścieniu dihydrotiazyny, ale zlokalizowanego pomiędzy C₃ i C₄, powoduje utratę aktywności farmakologicznej tych związków (atom azotu położony płasko lub prawie płasko). Taka sytuacja ma miejsce w Δ -3-cefemie i jego pochodnych. Analogicznie jak penicyliny, cefalosporyny ulegają procesom degradacji na drodze hydrolizy wiązania β -laktamowego w środowisku wodnym. Powstające produkty nie wykazują działania bakteriobójczego [3-6].

Biorąc pod uwagę spektrum działania przeciwbakteryjnego cefalosporyn, ich oporność na β -laktamazy, właściwości farmakologiczne oraz kolejność wprowadzania do terapii, antybiotyki te zostały podzielone na tzw. generacje [2]. Wśród stosowanych powszechnie w terapii wyodrębnia się zazwyczaj pięć generacji cefalosporyn.

Do generacji pierwszej zalicza się cefalosporyny o małej oporności na działanie β -laktamaz, charakteryzujące się silniejszym działaniem na bakterie Gram+ niż Gram-. Grupę tą stanowią aryłowe pochodne kwasu 7-AC z grupą acetoksymetylową, która może być wymieniona na grupę metylową lub atom chloru; należą do niej: cefalotyna, cefacetryl, cefalorydyna, cefradyna, cefazolina, cefaleksyna, cefaklor. Cefalosporyny drugiej generacji wykazują dużą oporność na działanie β -laktamaz i silniej działają na bakterie Gram- niż Gram+. Do grupy tej należą: cefamandol, cefuroksym, cefoksytyna, cefotiam, ceforanid, cefmentazol, cefbuperazon. Do struktury chemicznej w położeniu 3 wprowadzono ugrupowanie karbamoilooksymetylowe (ester acetoksyetylowy cefuroksymu) lub metylotetrazolilotiometylowe (cefamandol). Trzecia generacja to cefalosporyny, które wykazują bardzo dużą oporność na działanie β -laktamaz, silniej działają na bakterie Gram- niż Gram+ oraz są aktywne w stosunku do wszystkich bakterii Gram- z wyjątkiem *Actinetobacter* (cefotaksym, cefoperazon, ceftazidim, ceftriaksion, cefiksim). Natomiast cefalosporyny czwartej generacji (cefepim, cefpirom, ceftan) lepiej przenikają do płynów ustrojowych i tkanek wykazując dużą aktywność wobec bakterii Gram-. Znajdują one zastosowanie w leczeniu ciężkich zakażeń wywołanych m.in. przez *Enterobacteriaceae*. Cefalosporyny piątej generacji (ceftobiprol, ceftarolina), o szerokim spektrum działania przeciwbakteryjnego, aktywne wobec Gram+ zarodnikowcom włączając odporne na metycylinę szczepy gronkowca (MRSA, *methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), podawane pozajelitowo wykazują dużą biodostępność, łatwo przenikają do płynu mózgowo-rdzeniowego. Ze względu na aktywność wobec bakterii Gram- i odporności na działanie β -laktamaz można je podzielić na grupę ceftobiprołu wykazującą aktywność wobec bakterii Gram- analogiczną do cefalosporyn czwartej generacji o dużej odporności na działanie β -laktamaz oraz grupę ceftaroliny o ograniczonej aktywności wobec bakterii Gram- i małej odporności na działanie β -laktamaz [7].

Cefalosporyny stosowane w lecznictwie stanowią dzisiaj obszerną, wciąż dynamicznie powiększaną grupę antybiotyków. Powszechność ich stosowania jest uwarunkowana możliwościami modyfikacji macierzystej struktury, co wiąże się z tworzeniem nowych pochodnych i sukcesywnym poszerzaniem spektrum działania terapeutycznego. Z tego względu podjęcie badań mających na celu opracowanie nowych, prostych i szybkich metod mających zastosowanie do wyznaczania parametrów charakteryzujących właściwości fizykochemiczne (tj. lipofilowość)

już istniejących jak i potencjalnych nowych leków, wydaje się być celowe i zasadne – zwłaszcza, że procedury te cechuje duża czułość i rzetelność otrzymanych wyników.

Jednym z najważniejszych parametrów określających aktywność farmakokinetyczną, farmakodynamiczną oraz toksyczną danej substancji jest lipofilowość. Pojęcie to definiowane jest poprzez powinowactwo substancji do dwóch niemieszających się faz: lipidowej oraz wodnej. Parametr ten jest wykorzystywany podczas tworzenia nowych, biologicznie czynnych substancji, a także do oceny aktywności biologicznej związków/leków, istniejących już na rynku farmaceutycznym. Od wielu lat lipofilowość stanowi przedmiot eksperymentów oraz dociekań naukowych [8]. Prawo podziału sformułowane przez Waltera H. Nernsta opisuje stan równowagi termodynamicznej w określonej temperaturze i przy danym ciśnieniu, w której stosunek stężeń substancji rozpuszczonej w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach jest wielkością stałą. Ilościowo zjawisko to określa współczynnik podziału. Po raz pierwszy termin ten został użyty do oceny lipofilowości w 1964 roku, aby śledzić zachowanie leku w organizmie człowieka po jego podaniu. Wartość ta pomaga scharakteryzować możliwości wchłaniania leku, przepuszczalności przez bariery biologiczne, absorpcji, wiązania z białkami, interakcji lek-receptor, przenikania do krwi i mózgu, metabolizmu oraz wydalania. Możliwość oceny absorpcji leku jest kluczowym aspektem w procesie tworzenia nowych leków, zwłaszcza podawanych w formie doustnej [9].

Aktywność biologiczna związku najczęściej rośnie ze wzrostem lipofilowości, ponieważ wzrasta powinowactwo i przepuszczalność substancji przez błony biologiczne. Związki charakteryzujące się wysoką lipofilowością wykazują większe powinowactwo do białek osocza, w związku z czym są łatwiej transportowane przez barierę krew-mózg. Równocześnie zbyt duża lipofilowość jest niekorzystna, bowiem zmniejsza się absorpcja leku po podaniu doustnym oraz wzrasta tendencja do bioakumulacji. W praktyce należy dążyć do wyboru związku o optymalnych właściwościach hydrofobowo-hydrofilowych o pośredniej wartości współczynnika podziału [10]. Farmakologiczne działanie substancji chemicznej związane jest z jej lipofilowością, dlatego też wielkość ta jest wykorzystywana w projektowaniu nowych struktur potencjalnych leków oraz optymalizacji właściwości farmakokinetycznych opracowywanej substancji czynnej [11]. Duży postęp w dziedzinie kwalifikowania substancji do wczesnej fazy badań przyszłych leków zagwarantowały badania Lipińskiego i opisanie tak zwanej reguły pięciu [12,13]. W latach 60-tych pojawiła się dziedzina nauki zajmująca się analizą zależności między strukturą chemiczną a aktywnością biologiczną substancji chemicznej, QSAR (*Quantitative Structure Activity Relationship*) i QSPR (*Quantitative Structure Property Relationship*) [14]. Metody te wykorzystywane są do projektowania i poszukiwania nowych związków biologicznie czynnych, a uzyskane wyniki badań przyczyniają się do poznania skomplikowanych zjawisk zachodzących w organizmie człowieka. Ponadto można dzięki nim przewidywać potencjalną aktywność biologiczną substancji o podobnych strukturach oraz projektować substancję odmienną strukturalnie, która będzie wykazywała pożądany efekt działania na receptor i w konsekwencji na organizm

człowieka. Dzięki takiemu rozumowaniu naukowcy są w stanie szybciej i taniej projektować nowe związki – potencjalne leki [15,16].

Lipofilowość jest wypadkową sił hydrofobowych i dyspersyjnych wpływających na zachowanie niepolarnych fragmentów cząsteczki związku chemicznego oraz wiązań i oddziaływań elektrostatycznych tworzących się między polarnymi i zjonizowanymi ugrupowaniami. Możliwe są więc próby przewidywania jej wartości na podstawie budowy chemicznej związku, jednakże metody te (*in silico*) pozwalają na uzyskanie jedynie przybliżonych wyników. W celu doświadczalnego wyznaczenia parametrów charakteryzujących lipofilowość stosowane są nadal tradycyjne metody ekstrakcji ('shake-flask' oraz 'stir-flask'), jednak są one pracochłonne i mało precyzyjne [17,18]. Przy ich zastosowaniu tymi można wyznaczyć wartość współczynnika podziału substancji o małej i średniej lipofilowości (logP w zakresie od -3 do +3). Istotną alternatywę dla nich stanowią metody chromatograficzne, zwłaszcza w odwróconym układzie faz (RP-18), pozwalające na określenie lipofilowości w szerokim zakresie (logP od 1 do 8) [19,20]. Budowa powierzchni fazy stacjonarnej (np. RP-18) jest zbliżona do błony biologicznej. Charakteryzuje się właściwościami anizotropowymi, zawiera długie, węglowodanowe łańcuchy, które stanowią film hydrofobowy. Dodatkowo metody chromatograficzne charakteryzuje szybkość i prostota, duża precyzja i odtwarzalność wyników. Umożliwiają wyznaczanie parametrów lipofilowości dla kilku substancji jednocześnie oraz analizę związków asocjujących, dysocjujących lub mało stabilnych. Ograniczeniem ich stosowania jest jedynie niemożność korzystania z silanizowanego żelu krzemionkowego w pH powyżej 8. Spośród metod chromatograficznych stosowanych do wyznaczania lipofilowości wyraźnie wyróżnia się metoda chromatografii cienkowarstwowej (TLC), zwłaszcza z uwagi na szybkość i prostotę wykonania. Metodą TLC można jednocześnie przeanalizować dużą grupę związków o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych, a do przeprowadzenia badań potrzebna jest niewielka ilość oznaczanego związku. Na wynik analizy nie wpływają zanieczyszczenia mogące występować w próbce, nie jest także konieczna ilościowa analiza analitu. Odtwarzalność wyników otrzymanych tą metodą jest większa niż w tradycyjnych technikach ekstrakcyjnych. Ponadto możliwa jest standaryzacja otrzymanych wartości [21,22].

Badania lipofilowości zasadniczo mają na celu przewidywanie sposobu zachowania się leku w organizmie, dlatego ważne jest, aby stosowana metoda odwzorowywała jak najdokładniej warunki naturalne. Z tego względu coraz większą popularnością cieszą się sztuczne błony biologiczne (IAM, *Immobilized Artificial Membrane*). Są one zbudowane, podobnie jak błony komórkowe, z fosfolipidów (głównie fosfatydylocholino), cząsteczek o amfifilowym charakterze, przyłączonych kowalencyjnie w monowarstwie do matrycy przez łańcuch propyloaminowy. Ich polarne fragmenty skierowane są na zewnątrz, tworząc środowisko zbliżone do rzeczywistego. Na podstawie badań dowiedziono, że współczynnik retencji wyznaczony za pomocą IAM lepiej obrazuje transport substancji przez bariery biologiczne, niż wartości uzyskane z wykorzystaniem typowej fazy oktadecylosilanowej (ODS) [23].

Pośród innych metod stosowanych do wyznaczenia lipofilowości można odnotować także metody optyczne oraz elektrochemiczne [24,25]. Kolejną grupę stanowią wspomniane wcześniej metody obliczeniowe *in silico* (atomowe, fragmentów czy oparte na strukturze całych cząsteczek), wykorzystujące oprogramowanie oparte na algorytmach matematycznych [26,27]. Dostępna jest duża liczba programów komputerowych, dzięki którym można przeprowadzić obliczenia deskryptorów opisujących lipofilowość.

Od pewnego czasu analizą danych przez zastosowanie zaawansowanych modeli matematycznych i statystycznych zajmuje się nowa dziedzina nauki – chemometria. Współczesny sprzęt laboratoryjny stosowany w badaniach biologicznych i medycznych, może generować duże ilości danych pomiarowych. Zaawansowane metody chemometryczne są w takich sytuacjach jedyną możliwością analizy porównawczej, poprzez modelowanie zachodzących procesów, rozpoznawanie i klasyfikację próbek, przewidywanie pewnych parametrów próbki. Techniki chemometryczne wykorzystywane są także do kontroli jakości procesów technologicznych i oceny właściwości produktów farmaceutycznych [28,29]. W wyniku skomputeryzowanych procedur wielowymiarowej analizy danych można uzyskać istotne informacje, często ukryte w dużym zbiorze danych. Zarówno badania statystyczne (analiza regresji) jak i metody chemometryczne znalazły zastosowanie w wielu ośrodkach prowadzących analizy chemiczne i biologiczne [30].

Analiza Głównych Składowych (PCA) jest nienadzorowaną metodą uzyskiwania istotnych informacji z zestawów wyników, identyfikowania trendów i wyrażania danych tak, aby wyodrębnić zarówno podobieństwa, jak i różnice [31,32]. Może być ona wykorzystywana do ogólnej oceny współzależności pomiędzy zmiennymi, do analizy zmian we współliniowości [33] oraz do zmniejszenia liczby analizowanych zmiennych podczas monitorowania procesu [34-36]. Ponieważ PCA może być wykorzystywana do porównania danych uzyskanych na drodze różnych eksperymentów, w prezentowanych dalej pracach zastosowano ją do analizy uzyskanych eksperymentalnie i obliczonych deskryptorów lipofilowości w wielowymiarowy sposób. Przy zastosowaniu PCA liczba analizowanych zmiennych w zbiorze danych zmniejsza się poprzez znalezienie ich kombinacji liniowej, która wyjaśnia ich zróżnicowanie (tzw. wariancję wewnętrzną) [37]. Ponadto można uzyskać miarę lipofilowości, stosując PCA bezpośrednio do uzyskanych doświadczalnie wartości R_F i R_M traktując wartość pierwszej składowej jako taką miarę. Otrzymany metodą PCA wykres przedstawia największą możliwą informację w wejściowych danych chromatograficznych, jaką można zobrazować w formie dwuwymiarowej. Wartości odpowiadające pierwszej głównej składowej (PC1) wyjaśniają najwięcej informacji, jaką może podać z konkretnych danych jedna zmienna i zostały uznane za istotne rozwiązanie dla wyznaczania lipofilowości na podstawie danych chromatograficznych. Analiza wektorów obciążeń może z kolei dostarczyć użytecznych informacji na temat chromatograficznego zachowania badanych substancji oraz mechanizmów ich retencji [38]. Można też stwierdzić, że druga lub trzecia główna składowa zawierają zwykle inne, niezależne, głęboko ukryte i istotne trendy retencji. Wykresy dla głównych składowych przydatne są jako narzędzie wyrażające zależności

między cechami charakterystycznymi badanych substancji w poszukiwaniu trendów, grupowania lub wyznaczania wartości wyraźnie odbiegających.

Analiza wielolinearna (*multi-way*) stanowi rozszerzenie modelu głównych składowych (analizujących macierz jako strukturę bilinearną) na dane wielolinearne i daje pożądane rozszerzenie diskutowanych metod w sytuacjach, gdy otrzymane wyniki spełniają takie założenia (np. dane zależności związek x modyfikator x stężenie tworzą tensor – „kostkę”). Najprostszą i najczęściej stosowaną metodą analizy wielolinearnych zbiorów danych jest PARAFAC (*Parallel Factor Analysis*) [39]. W przypadku analizy tensora wartości retencji zamiast macierzy, wartości retencji są modelowane jako suma iloczynów trzech (nie dwóch, jak w PCA) współczynników. Podobnie jak w przypadku analizy PCA do analizy i interpretacji, można się posłużyć uzyskanymi składowymi [40-43].

Ostatnią stosowaną w niniejszych pracach metodą jest hierarchiczna analiza skupień HCA (*Hierarchical Cluster Analysis*). Stanowi ona algorytmiczne podejście w poszukiwaniu wyodrębnionych grup w zbiorze danych na podstawie macierzy podobieństwa lub odmienności pomiędzy obiektami. Wspomniane grupy są hierarchicznie zorganizowane i mogą być prezentowane jako dendrogram [44,45].

W literaturze można znaleźć prace, w których badacze zastosowali wielowymiarowe metody statystyczne np. do poszukiwania kluczowych cech dotyczących cząsteczek i wskaźników aktywności przeciwrakowej [46]. Analizę PCA wykorzystywano do zredukowania i wyodrębnienia istotnych informacji z dużej ilości danych eksperymentalnych [47-49]. Dane chromatograficzne bardzo często daje się zestawić w tensor zawierający odpowiadające sobie zmienne (czyli dane mają faktycznie strukturę trójlinearną) [50-52].

3.2.2. Cel naukowo-badawczy

Głównym celem podjętych badań była analiza właściwości wybranych cefalosporyn w kontekście określenia powinowactwa do błon biologicznych, a także opracowanie nowych metod służących identyfikacji i analizie ilościowej substancji czynnej w złożonych matrycach oraz ewentualnych produktów degradacji analizowanych antybiotyków, powstających w warunkach stresowych. Prezentowane prace stanowią kontynuację prowadzonych przeze mnie wcześniej badań i stanowią próbę kompleksowej oceny wybranej grupy leków. Badania przeprowadzone w ramach prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe były realizowane w czterech głównych nurtach badawczych:

- badania lipofilowości wybranych cefalosporyn z wykorzystaniem różnych technik analitycznych
- badania stabilności substancji czynnych w warunkach stresowych
- zastosowania metod chemometrycznych do analizy danych eksperymentalnych
- opracowania nowych metod analitycznych do oznaczania substancji czynnych w złożonej matrycy biologicznej

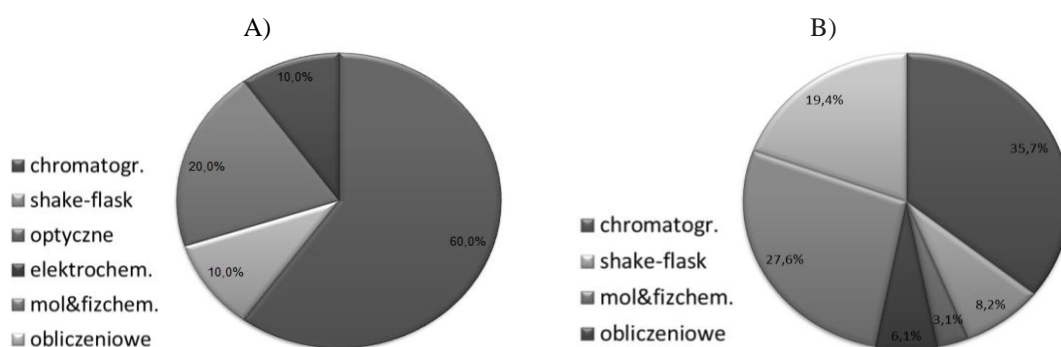
3.2.3. Omówienie wyników stanowiących podstawę habilitacji

Wynikiem przeprowadzonego na początku badań studium literaturowego było usystematyzowanie aktualnej wiedzy na temat lipofilowości, ze szczególnym uwzględnieniem różnorodnej metodyki prowadzenia badań [H1]. Praca ta stała się punktem wyjścia do opracowania własnych metod i ustalenia istniejących zależności w badaniach tej właściwości związków biologicznie czynnych. Celem kolejnych prac prezentowanych jako osiągnięcie naukowe [H2,H3] była analiza parametrów lipofilowości wybranych leków z grupy cefalosporyn metodą chromatografii cienkowarstwowej z wykorzystaniem faz stacjonarnych o różnych właściwościach i użyciem organicznych modyfikatorów faz ruchomych różniących się polarnością (siłą elucji; metanol, aceton, 1,4-dioksan, acetonitryl, 2-propanol). Otrzymane wartości parametru R_{M0} ($\equiv \log P$) skorelowano z parametrami lipofilowości otrzymanymi metodami obliczeniowymi oraz wyznaczonymi eksperymentalnie z zastosowaniem fazy IAM ($\log k_{IAM}$), poszukując ich liniowej zależności. W pracach wykorzystano programy komputerowe w celu wyznaczenia współczynnika podziału ($\log P$) poprzez wskaźniki lipofilowości obliczone w oparciu o parametry stanu elektrotopologicznego ($A\log P$), deskryptory grup składowych ($AC\log P$, $M\log P$), metody fragmentacyjne i redukcyjne (KOWWIN), deskryptory typu atomu i współczynników korekcyjnych ($X\log P_2$, $X\log P_3$), a także deskryptory rozpuszczalności ($A\log P$). Uzyskane dane porównano z wartościami $\log P^*$ odpowiadającym wartościom $\log D$ w punkcie izokratycznym oraz z wartościami $\log P^{**}$ odpowiadającymi $\log P$ dla związków niejonowych, które obliczono wykorzystując program Marvin Sketch. Następnie, bazując na wartościach R_{M0} analizowano zależności między właściwościami molekularnymi (budową chemiczną) związków a lipofilowością. Otrzymane wartości R_{M0} porównano również z dostępnymi w literaturze parametrami aktywności przeciwbakteryjnej (MIC, *Minimal Inhibitory Concentration*), wykazując w niektórych przypadkach liniową zależność pomiędzy tymi danymi. Na podstawie wyników przeprowadzonych analiz m.in. prezentowanych w pracach H2 i H3 oraz H1 można zaobserwować, że technika TLC stanowi dobry instrument dla analityka, szczególnie podczas wstępnych badań lipofilowości związków chemicznych – potencjalnych leków, we wczesnej fazie ich opracowywania. Kolejny, bardzo istotny problem stanowi proces ewentualnej degradacji substancji aktywnej, na którego przebieg ma wpływ wiele czynników tj. skład matrycy (substancje pomocnicze), promieniowanie UV-Vis, pH, obecność dodatkowych składników np. jonów metali bądź czynników redoks. Prezentowane poniżej prace uzupełniają wiedzę dotyczącą tych zagadnień poprzez określenie kinetyki zachodzących procesów oraz identyfikację powstających produktów [H4-H6]. W pracach prezentowanych jako osiągnięcie habilitacyjne [H2,H3,H5,H6] wykorzystane zostały metody chemometryczne (hierarchiczna analiza skupień HCA, PCA i PARAFAC. Można stwierdzić, że metody te istotnie wspomogły interpretację analizowanych wskaźników lipofilowości poprzez umożliwienie porównania ich między sobą oraz z deskryptorami molekularnymi (wartościami lipofilowości obliczonymi algorytmami *in silico*), jak również wykazanie trendów zmian zachodzących w badanej grupie związków, w warunkach stresowych. Konsekwencją

realizacji szczegółowych badań z zakresu analizy cefalosporyn było opracowanie nowych metod, optymalnych procedur, służących nie tylko analizie jakościowej ale również określeniu ilościowej zawartości składników. Postępowanie takie stanowi warunek konieczny opracowywania i adaptacji metod badawczych pozwalających, w aspekcie praktycznym, na rzetelne oznaczenie substancji w złożonej matrycy jaką stanowi materiał biologiczny. Prezentowana metodyka posiada aspekt praktyczny umożliwiający szybką ocenę stężenia substancji leczniczej w krążeniu pacjenta jak i wydalanej z organizmu [H4, H7].

[H1] *Dąbrowska M., Starek M., Skuciński J., Lipophilicity study of some non-steroidal anti-inflammatory agents and cephalosporin antibiotics: a review, Talanta, 2011, 86, 35–51*

Realizacja badań lipofilowości leków z grupy cefalosporyn została rozpoczęta od przeprowadzenia studium piśmiennictwa, w celu usystematyzowania wiedzy na temat dostępnych metod stosowanych do wyznaczenia parametrów charakteryzujących tą właściwość związków. W opracowanej publikacji zaprezentowano różne techniki analityczne stosowane do określania lipofilowości niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NSAID) i antybiotyków cefalosporynowych. Omawiane leki różnią się zarówno pod względem struktury chemicznej jak i działań farmakologicznych, jednakże często w terapii są one stosowane razem. Przegląd obejmuje ponad sto prac przedstawiających metody ekstrakcyjne ('shake-flask'), chromatograficzne, optyczne, elektrochemiczne, procedury obliczeniowe oraz inne, wykorzystujące właściwości molekularne i fizykochemiczne zastosowane w badaniach lipofilowości omawianych grup związków. Na Rys. 2 przedstawiono procentowy udział tychże metod, z którego wynika, że metody chromatograficzne są najbardziej popularne w przypadku wyznaczania lipofilowości NSAIDs i antybiotyków cefalosporynowych. Celem pracy było także przybliżenie pojęć i teorii stanowiących podstawę tradycyjnego i współczesnego podejścia do pomiarów lipofilowości, oraz sposobów ich wyznaczania oferowanych przez różnych badaczy, stosujących zróżnicowany warsztat analityczny.



Rysunek 2. Metody badań lipofilowości A) NSAIDs, B) cefalosporyn

Przedstawione w niniejszym przeglądzie pojęcia mogą stanowić podstawę do rozwoju różnych metodologii badań lipofilowości, zwłaszcza biorąc pod uwagę wielodyscyplinarny charakter takich działań.

[H2] *Dąbrowska M., Komsta Ł., Krzek J., Kokoszka K., Lipophilicity study of eight cephalosporins by reversed-phase thin-layer chromatographic method, Biomedical Chromatography, 2015, 29, 1759–1768*

Celem badawczym pracy było wyznaczenie względnych wartości lipofilowości (R_{M0}) ośmiu cefalosporyn będących przedstawicielami różnych generacji tj. cefaleksyna (I), cefazolina (I), cefuroksym (II), cefaklor (II), cefotaksym (III), ceftriakson (III), cefpodoksym proksetylu (III) i cefepim (IV) techniką chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz (RP-TLC). Jako niepolarną fazę stacjonarną wykorzystano płytki RP-18, a jako fazy ruchome polarne zastosowano mieszaniny wody i pięciu organicznych modyfikatorów różniących się siłą elucji (metanol, acetonitryl, aceton, 1,4-dioksan, 2-propanol). Związki chemiczne o pośredniej lub wysokiej lipofilowości mogą wykazywać marginalne odległości migracji w czystej wodzie, zmniejszając tym samym możliwość dokładnego pomiaru, z tego powodu stosuje się mieszaniny binarne nawet na fazach stacjonarnych pozwalających na stosowanie czystej wody. Płytki RP-18 są najpopularniejszą fazą stacjonarną do wyznaczania lipofilowości ze względu na zdolność, jaką wykazuje ta postać adsorbentu podczas rozdzielania związków o bardzo zróżnicowanych właściwościach. Są one pokryte zmodyfikowanym żelom krzemionkowym wykazującym niewielką estryfikację grup hydroksylowych, przez co możliwe jest stosowanie faz ruchomych zawierających do 80% wody. Uzyskane w efekcie podjętych badań wyniki wskazują na liniową zależność wartości współczynników opóźnienia R_F vs % zawartości organicznego modyfikatora w fazie ruchomej w zakresie 25-80% organicznego modyfikatora dla cefazoliny, cefuroksymu, cefotaksymu, ceftriaksonu oraz 35-80% dla cefepimu, 40-80% dla cefaleksyny, cefakloru i 45-80% dla cefpodoksymu. Niskie stężenie organicznego modyfikatora w fazie ruchomej powodowało, że analizowane związki pozostawały na linii startu, natomiast dla stężenia powyżej 80% związki lokalizowano w pobliżu czoła eluentu. Następnie określono zależności między uzyskanymi wartościami retencji (R_F , R_M), a stężeniem zastosowanych organicznych modyfikatorów w fazie ruchomej. Badane cefalosporyny wykazały typowe tendencje zachowania we wszystkich mieszaninach; wartości R_M malały liniowo wraz ze wzrostem ilości organicznego modyfikatora w eluencie. Dla każdego antybiotyku ustalono korelacje pomiędzy ułamkiem objętościowym organicznego rozpuszczalnika a wartościami R_M , uzyskując wysokie wartości współczynników korelacji (w większości przypadków $r > 0,95$).

Wartości R_M wyznaczono dla wszystkich badanych stężeń użytych organicznych modyfikatorów, a otrzymane wyniki ekstrapolowano do 0% organicznego modyfikatora. Poszczególne antybiotyki wykazywały odmienną retencję wynikającą z różnic w oddziaływaniach pomiędzy substancją a rozpuszczalnikiem oraz substancją a fazą stacjonarną, co potwierdziły wyznaczone parametry krzywych regresji.

Najistotniejsze dane uzyskane z wykreślonych krzywych (R_M vs stężenie organicznego modyfikatora) to nachylenie a , odpowiadające specyficznemu hydrofobowemu oddziaływaniu substancji, wartość $b = R_{M0}$ (parametr lipofilowości) oraz współczynnik korelacji (r). Wyznaczone w ten sposób wartości R_{M0} różnią się dla każdego związku i zależą od jego struktury chemicznej, m.in. rodzaju podstawnika obecnego

w cząsteczce. Wartości R_{M0} uzyskane z użyciem fazy ruchomej metanol-woda były większe niż analogiczne wartości uzyskane dla faz ruchomych z dodatkiem acetonitrylu, acetonu, 1,4-dioksanu i 2-propanolu. Porównując wartości R_{M0} uzyskane dla cefaleksyny i cefakloru, cefuroksymu i ceftriaksonu, można stwierdzić, że lipofilowość tych substancji zmienia się podobnie dla każdego zastosowanego organicznego modyfikatora. Natomiast lipofilowość cefpodoksymu proksetylu i cefotaksymu w układzie faz zawierającym acetonitryl przyjmuje zawsze większe wartości niż w fazach z 2-propanolem, analogicznie jak dla cefotaksymu, ceftriaksonu i cefuroksymu w fazach z 1,4-dioksanem. Różnice te można wyjaśnić lepszą rozpuszczalnością poszczególnych cefalosporyn w metanolu niż w pozostałych rozpuszczalnikach, a także zróżnicowaniem ich siły elucji. Wyznaczone parametry lipofilowości wyrażone poprzez wartości R_{M0} mieściły się w zakresie od -0,7327 do 3,625. Na podstawie uzyskanych dla każdego organicznego modyfikatora wyników można stwierdzić, że najmniej lipofilowy charakter wykazuje ceftriakson (R_{M0} w zakresie od -0,7327 do -0,3107), najbardziej lipofilowy (R_{M0} od 0,8557 do 3,6255) jest cefpodoksym proksetylu. Brak istotnej statystycznie korelacji pomiędzy wartościami R_{M0} a a sugeruje, że chromatograficzne mechanizmy retencji są różne w grupie leków poddanych badaniom (niehomologiczna seria leków).

W dalszym etapie badań porównano aktywność analizowanych cefalosporyn przeciwko dwóm grupom bakterii, Gram–: *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* i Gram+: *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, wyrażoną jako MIC. Stwierdzono, że cefpodoksym proksetylu wykazuje wysoką lipofilowość przy stosunkowo niskiej wartości MIC z wyjątkiem *S. aureus*. Cefaleksyna mająca charakter silnie lipofilowy wykazuje większy MIC i niższą aktywność wobec *H. influenzae* i *S. pneumoniae*. Ceftriakson ma niski MIC zarówno wobec bakterii Gram+ i Gram– w połączeniu ze słabym charakterem lipofilowym. Pośredni charakter w połączeniu z aktywnością przeciwko bakteriom zarówno Gram+ i Gram– wykazują cefotaksym, cefuroksym, cefazolina i cefepim.

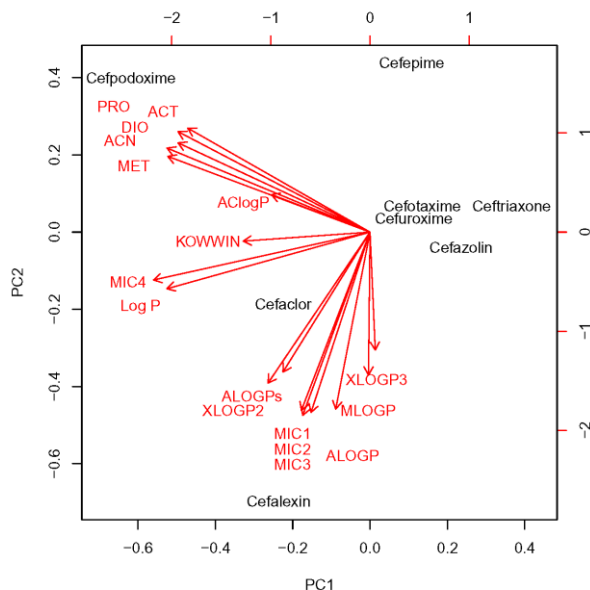
W kolejnym etapie pracy porównano uzyskane chromatograficznie parametry lipofilowości z molekularnymi właściwościami związków i zaobserwowano, że wraz ze wzrostem masy cząsteczkowej maleje lipofilowość analizowanych cefalosporyn (za wyjątkiem cefepimu i cefpodoksymu proksetylu).

Z uwagi na bardzo dużą liczbę związków chemicznych, zwłaszcza nowych struktur syntetyzowanych na bazie znanych cząsteczek, wykazujących potencjalną aktywność biologiczną, nie jest możliwe przeprowadzenie pełnej analizy ich właściwości fizykochemicznych, m.in. badań lipofilowości, metodami eksperymentalnymi. Powstało więc wiele programów komputerowych wspomagających te badania. Metody obliczeniowe przewidywania lipofilowości można podzielić na dwie główne grupy: metody opierające się na cechach budowy chemicznej, w których cząsteczki „cięte” są na mniejsze fragmenty lub pojedyncze atomy z indywidualnym wkładem w lipofilowość cząsteczki (ALOGP, XLOGP2, XLOGP3, KOWWIN, ACLogP) bądź bazujące na topologii całej cząsteczki (MLOGP, ALOGPs) [53].

Przeprowadzony przegląd piśmiennictwa wskazuje na wiele badań porównujących dane uzyskane metodami eksperymentalnymi i obliczeniowymi. Często wskazują one na małą korelację pomiędzy uzyskanymi w ten sposób danymi. Duża liczba istniejących faz stacjonarnych o zróżnicowanych właściwościach nastęrcza problemy związane z wyborem najbardziej odpowiedniej. Poszukiwania dotyczą zarówno najlepszego rozpuszczalnika jak i adsorbentu, czyli układu faz chromatograficznych, jak najlepiej odpowiadającego warunkom panującym w organizmie człowieka. Dlatego też otrzymane chromatograficznie wyniki są porównywalne z wartościami obliczonymi teoretycznie.

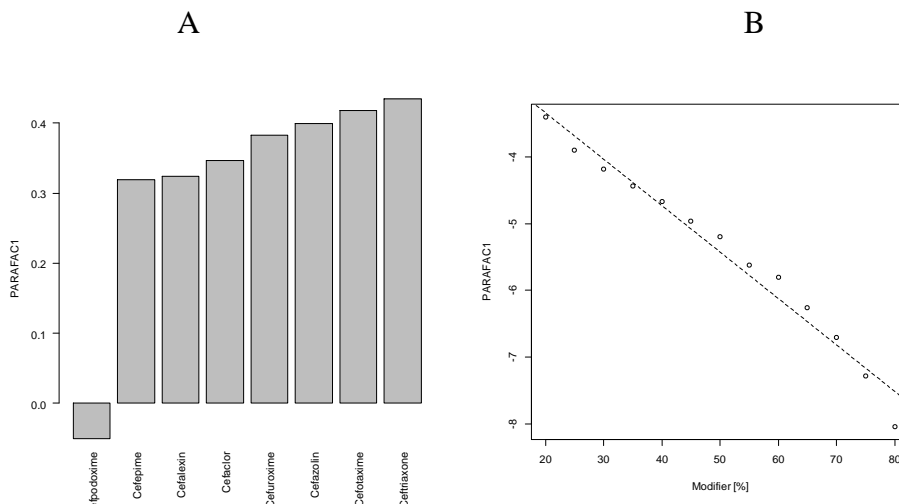
Bazując na uzyskanych eksperymentalnie oraz dostępnych w literaturze danych dla wybranych cefalosporyn przeanalizowano zależności między współczynnikami retencji uzyskanymi metodą RP-TLC (R_{M0}), wartościami $\log P$ otrzymanymi metodami obliczeniowymi (AClogP, ALOGP, KOWWIN, ALOGP, XLOGP2 i MLOGP, XLOGP3) oraz wyznaczonymi metodą 'shake-flask' ($\log P_{\text{exp}}$ oktanol-woda) [54]. Porównując odpowiednie parametry we wszystkich analizowanych wariantach stwierdzono wysoką korelację pomiędzy nimi ($r > 0.90$), za wyjątkiem układów aceton-woda ($r \sim 0.36$). Najwyższą zgodność zaobserwowano dla faz acetonitryl-woda ($r \sim 0.95$).

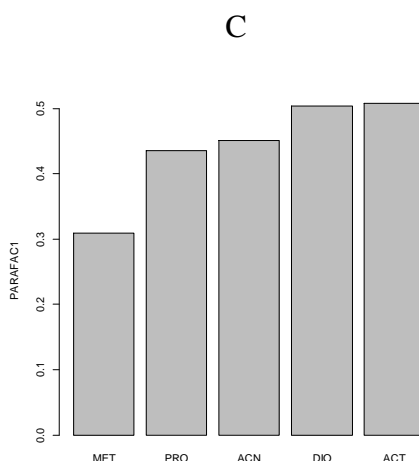
Wszystkie analizowane parametry lipofilowości, w kolejnym etapie pracy, zostały poddane całościowemu porównaniu metodą PCA. Na podstawie uzyskanych danych można wnioskować, że cefpodoksym proksetylu i cefepim różnią się znacząco w otrzymanych wartościach lipofilowości, przy czym dla cefpodoksymu proksetylu wartości są zawsze najwyższe. Analiza wektorów obciążeń wskazuje, że metody obliczeniowe są bardzo słabo skorelowane z metodami chromatograficznymi, które natomiast są silnie powiązane między sobą (w obrębie zastosowanych modyfikatorów). Wartości $\log P_{\text{exp}}$ w większości przypadków skorelowane są z wynikami uzyskanymi metodą KOWWIN i znajdują się pośrodku między metodami chromatograficznymi i obliczeniowymi. Analiza potwierdza wyższość eksperymentalnej (chromatograficznej) oceny lipofilowości, w stosunku do metod obliczeniowych. Aktywność przeciwbakteryjna (wyrażona poprzez MIC) okazała się być znacząco skorelowana głównie z wskaźnikami lipofilowości wyznaczonymi metodami obliczeniowymi, podczas gdy MIC dla *S. aureus* jest znacząco skorelowany z wartościami uzyskanymi metodą 'shake-flask' ($\log P_{\text{exp}}$).



Rysunek 3. Wartości głównych składowych i wektory obciążeń PCA macierzy lipofilowości.
Objaśnienia: ACN – acetonitryl, ACT – aceton, MET – metanol, DIO – dioksan, PRO – propanol

W celu zbadania zależności w obrębie uzyskanych danych chromatograficznych, wartości R_M zostały zestawione jako tensor o wymiarach: 8 związków \times 13 stężeń \times 5 modyfikatorów. Pozwala to na rozkład metodą PARAFAC, która zakłada, że R_M związku chemicznego w danym układzie jest iloczynem trzech niezależnych współczynników (nazywanych „wkładami” lub „kontrybucjami”) związanych z substancją, stężeniem i modyfikatorem. Model ten wyjaśniał 93,01% ogólnej wariancji (Rys. 3). PARAFAC odnosi się do składników złożonych zgodnie z lipofilowością wyznaczoną chromatograficznie (Rys. 4A); ilość modyfikatora reprezentuje siłę elucyjną fazy ruchomej (Rys. 4C). Analizując wpływ stężenia modyfikatora otrzymano korelację Pearsona równą $-0,9862$ i zależność $y = -0,0695x (\pm 0,00351) - 1,944 (\pm 0,1873)$ (Rys. 4B) gdzie y jest wartością odpowiedniej składowej PARAFAC, a x jest stężeniem modyfikatora w procentach. Uzyskane wyniki potwierdzają, że wartości R_M mogą być modelowane metodą PARAFAC.





Rysunek 4. Składowe analizy PARAFAC: (A) substancje (posortowane w rosnącym porządku), (B) stężenie organicznego modyfikatora, (C) modyfikator

Podsumowując przeprowadzone analizy można stwierdzić, że molekularny mechanizm retencji jest analogiczny w przypadku wszystkich analizowanych związków i prawdopodobnie jest związany z ich podobną strukturą oraz właściwościami fizykochemicznymi. Z uzyskanych danych wynika, że zarówno programy obliczeniowe jak i metody chromatograficzne są bardzo użyteczne do analizy lipofilowości związków chemicznych, jednakże istnieją pewne ograniczenia ich stosowania. Uzyskane chromatograficzne wartości parametrów lipofilowości lepiej odzwierciedlają rzeczywiste właściwości fizykochemiczne badanych leków. Ponadto otrzymane wyniki wykazały, że RP-TLC może być właściwą techniką analityczną służącą do opisywania lipofilowego charakteru badanych cefalosporyn oraz analizy ich aktywności.

[H3] *Dąbrowska M., Starek M., Komsta E., Szafranski P., Stasiewicz-Urban A., Opoka W., Assessment of the chromatographic lipophilicity of eight cephalosporins on different stationary phases, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017, 101, 115–124*

W kolejnych badaniach podjęto próbę wyznaczenia metodami chromatograficznymi oraz przeanalizowania parametrów retencji dla ośmiu cefalosporyn (cefaleksyna, cefazolina, cefuroksym, cefaklor, cefotaksym, ceftriaksone, cefepim i cefpodoksym proksetylu). Zastosowano techniki HPLC z kolumną IAM oraz TLC z użyciem różnych adsorbentów tj. RP-2, RP-8, RP-18, -CN, -NH₂, -DIOL. Poszczególne fazy stacjonarne różniły się strukturą chemiczną, właściwościami fizykochemicznymi i polarnością. Jako fazy ruchome stosowano mieszaniny wody i metanolu oraz wody i acetonu w zmiennych proporcjach organicznego modyfikatora (od 30 do 80%).

Wyznaczone techniką TLC wartości R_F , odpowiadające poszczególnym antybiotyk, wzrastały, we wszystkich przypadkach, wraz ze wzrostem udziału procentowego organicznego modyfikatora w fazie ruchomej. Najwyższe wartości R_F uzyskano stosując fazy stacjonarne RP-2, a najniższe – płytki pokryte żel krzemionkowym z dołączonymi grupami -NH₂ (zarówno dla metanolowych jak i acetonowych faz ruchomych). Cefepim wykazywał zerową wartość R_F we wszystkich testowanych fazach ruchomych na płytkach RP-8 oraz przy niższych stężeniach metanolu (do 45%)

na płytkach $-NH_2$. Fakt ten można wyjaśnić większym powinowactwem antybiotyku do fazy stacjonarnej i mniejszą rozpuszczalnością w roztworach wodnych. Cefepim jest związkiem strukturalnie podobnym do innych aminotiazolilo metoksyimino pochodnych cefalosporyn trzeciej generacji. Dodatkowo naładowany czwartorzędowy fragment N-metylopirolidyny w pozycji 3 w jądrze cefemu powoduje, że zachowuje się on jako jon obojnaczy, co może wyjaśniać jego odmienne zachowanie w zmiennych warunkach badawczych. Cefpodoksym proksetylu również pozostawał na linii startu w fazie ruchomej o składzie woda-aceton na płytkach $-NH_2$ (dla wszystkich stężeń acetonu) oraz na płytkach RP-2 przy stężeniu metanolu do 40%. Takie zachowanie można wytłumaczyć mniejszą rozpuszczalnością badanego związku w acetonie, przez co wykazuje on słabsze powinowactwo do fazy ruchomej niż do mniej polarnej fazy stacjonarnej (mniejsza retencja).

Analiza obliczone wartości R_M można stwierdzić, że wzrastały one liniowo ze wzrostem ilości organicznego modyfikatora (metanolu i acetonu) w badanych fazach ruchomych. Obliczone współczynniki regresji dla wszystkich faz stacjonarnych były wyższe niż 0,95, a wyznaczone wartości R_{M0} dla badanych cefalosporyn mieściły się w zakresie od -0,8118 do 3,6255. Jak widać, różnią się one znacznie od siebie, co wiąże się z różnicami struktury chemicznej poszczególnych związków, a także właściwościami zastosowanych faz.

Zmiany wartości parametrów retencji wyznaczone dla cefepimu i ceftriaksonu wykazały podobną tendencję (R_F i R_M), co może być związane z obecnością w ich cząsteczkach grup metylowych przyłączonych do pierścienia β -laktamowego. Analogiczne zachowanie w badanych warunkach zaobserwowano w przypadku ceftriaksonu i cefazoliny, zwłaszcza na płytkach $-CN$.

Porównanie wartości R_{M0} otrzymanych dla badanych antybiotyków wskazało, że najbardziej lipofilowy charakter posiada cefpodoksymu proksetylu (na wszystkich testowanych fazach stacjonarnych; R_{M0} 0,2217 dla $-DIOL$ i 2,8973 dla $-NH_2$). Związek ten jest cząsteczką o najbardziej rozwiniętej strukturze; posiadający grupę metoksymetylową połączoną w pozycji C-3 struktury cefemu i grupę 1-(izopropoksy-karbonyloksy)etylową połączoną z grupą kwasową wiązaniem estrowym. Taka budowa może skutkować mniejszą retencją w układzie faz odwróconych (na płytkach RP-18, RP-8, RP-2 oraz z użyciem mieszaniny wody i metanolu jako fazy ruchomej). Poza wyznaczonymi eksperymentalnie parametrami R_{M0} , przeprowadzono obliczenia parametru $\log P^{**}$ przy użyciu programu *MarvinSketch*. Zgodnie z uzyskanymi wynikami dla obojętnych form badanych substancji można stwierdzić, że najbardziej lipofilowym antybiotykiem jest cefaleksyna ($\log P^{**}$ 0,12), a najmniej cefepim ($\log P^{**}$ -4,22).

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdzono, że na płytkach RP-8 uzyskano wyższe wartości R_{M0} niż na fazach bardziej polarnych. Zaobserwowano podobne zachowanie cefakloru i cefazoliny w układach woda-metanol na płytkach $-CN$, $-DIOL$ i RP-18 oraz w układach woda-aceton na płytkach $-CN$, $-DIOL$, RP-2 i RP-8. Porównując parametry lipofilowości dla wszystkich antybiotyków otrzymane dla poszczególnych układów można zauważyć, że najlepsza korelacja występuje w odwróconym układzie faz RP-2/RP-18 ($r > 0.99$) dla mieszanin woda-metanol.

Natomiast w fazach wodno-acetonowych tylko parametry R_{M0} wyznaczone z użyciem płytek -CN, RP-2 i RP-18 były dobrze skorelowane ($r > 0.92$). Najmniejszą zgodność wyników ($r < 0.15$) uzyskano dla układów woda/acetone i płytek -DIOL/RP-2, RP-18 i -NH₂/RP-2. Ponadto wyniki uzyskane na płytkach RP-8 oraz metodą HPLC-IAM wykazują, że najmniej lipofilowym związkiem spośród badanych jest ceftriakson (dla RP-8 wartość R_{M0} wynosiła -0,8118; $\log k'_{IAM} = -0,73$).

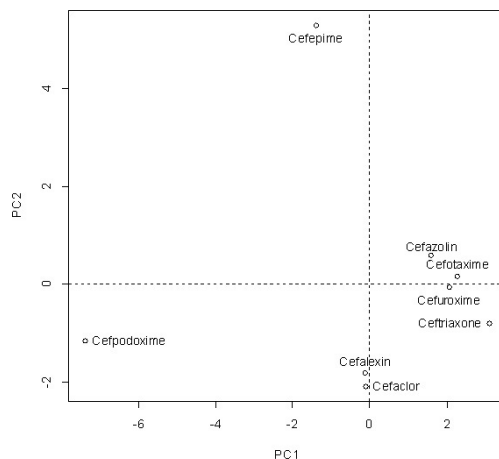
Antybiotyki β -laktamowe cechuje tendencja do asocjacji w hydrofilowych rozpuszczalnikach, co może mieć wpływ na wyznaczane eksperymentalnie wartości $\log P$. Wydaje się więc istotnym prowadzenie równoległe badań lipofilowości różnymi metodami, w tym obliczeniowymi, a następnie określenie korelacji pomiędzy uzyskanymi wynikami. Uzyskane w prezentowanej pracy chromatograficzne parametry lipofilowości (R_{M0}) porównano z wartościami $\log P$ dostępnymi w bazach danych obliczonymi przy użyciu różnych programów komputerowych. Nie stwierdzono istotnej zależności danych eksperymentalnych z danymi obliczeniowymi. Najlepszą korelację stwierdzono dla metody MLOGP i fazy -NH₂ w mieszaninach wodno-acetonowych ($r \sim 0,81$) oraz dla metody AClogP i płytek RP-8 w fazach ruchomych wodno-acetonowych i wodno-metanolowych ($r \sim 0,64$). Najsłabsze korelacje obserwowano dla metod ALOGP i XLOGP2 oraz wszystkich analizowanych faz ruchomych. Nie stwierdzono także istotnych związków pomiędzy doświadczalnie otrzymanymi wartościami parametrów retencji uzyskanymi metodą HPLC z kolumną IAM ($\log k'_{IAM}$) i TLC (R_{M0}). Najlepsze korelacje otrzymano w przypadku fazy -CN w układach woda/metanol i RP-8 w fazach woda/metanol lub woda/acetone ($r > 0,58$). Dobrą zgodność stwierdzono również porównując wartości R_{M0} uzyskane na płytkach -CN, -DIOL i RP-2 w układach woda/metanol z wartościami $\log P_{exp}$ wyznaczonymi techniką 'shake-flask' ($r > 0,68$).

W kolejnym etapie pracy przeprowadzono analizę PCA w celu zbadania podobieństwa wielowymiarowego macierzy retencyjnej. 44.60% całkowitej wariancji wyjaśniono przez pierwszą składową, a dalsze 21.56% drugą (ogółem 66.21%). Pierwsza składowa (PC1) wyjaśniła 57.9% całej wariancji retencji, co zostało wykorzystane jako kolejna miara lipofilowości. W podobny sposób przeprowadzono analizę PARAFAC (wymiary tensora: 8 związków x 11 stężeń x 12 układów, jeden czynnik w modelu), co zaowocowało uzyskaniem wyniku wyjaśniającego 95.6% całej wariancji.

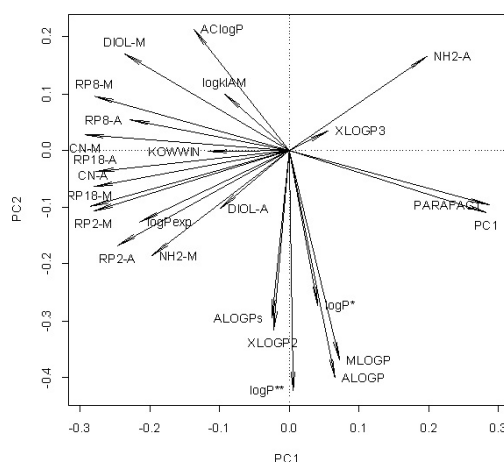
Cefepim i cefpodoksym proksetylu różnią się istotnie w zachowaniu chromatograficznym od pozostałych, analizowanych cefalosporyn. Chromatograficzne współczynniki R_{M0} są wzajemnie powiązane, a "średnia retencja" reprezentowana jest przez wartość PC1. Natomiast PC2 przedstawia istniejące różnice między wskaźnikami uzyskanymi różnymi metodami. Wyjątkiem są fazy stacjonarne NH₂-A (płytki -NH₂, modyfikator organiczny – acetone), które są ujemnie skorelowane ze wszystkimi innymi wskaźnikami chromatograficznymi. $\log P_{exp}$ i $\log k_{IAM}$ są również ściśle skorelowane z uzyskanymi chromatograficznie R_{M0} , co świadczy o podobieństwie wyników uzyskanych eksperymentalnie. Spośród metod obliczeniowych tylko KOWWIN wykazuje korelację ze wskaźnikami eksperymentalnymi. Wartości $\log P$ obliczone innymi metodami są słabo skorelowane (ortogonalne) z danymi eksperymentalnymi.

Dowodzi to, że metody obliczeniowe są wciąż zawodne w przewidywaniu zachowania złożonych cząsteczek jakimi są cefalosporyny.

Metody chromatograficzne są więc nadal potrzebne i nie można ich zastąpić innymi prostszymi sposobami. Techniki obliczeniowe mogą stanowić jedynie analizę wstępną, bądź pomocniczą określenia zachowania danego związku chemicznego w układzie faz o różnych właściwościach (polarności).



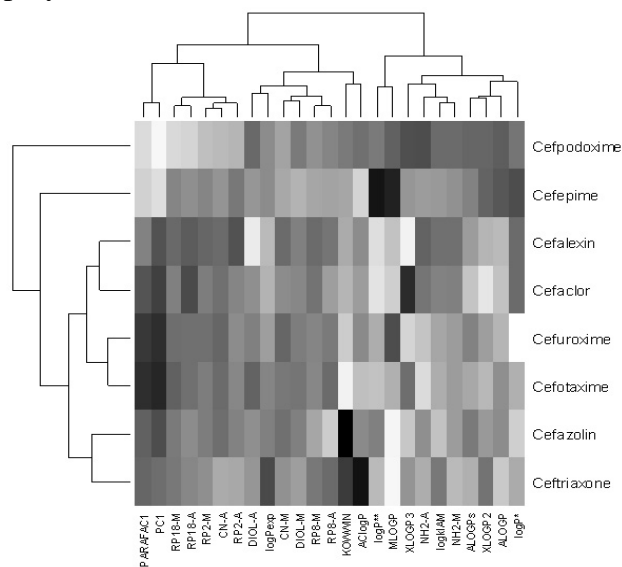
Rysunek 5. Wartości dwóch pierwszych głównych składowych analizy PCA macierzy lipofilowości ze skalowaniem



Rysunek 6. Wektory obciążeń dwóch pierwszych głównych składowych analizy PCA macierzy lipofilowości ze skalowaniem

Analiza HCA przeprowadzona na tych samych wynikach wykazała niemal taką samą strukturę danych. Cefpodoksym proksetylu i cefepim wyraźnie różnią się od pozostałych cefalosporyn, które tworzą jednorodną drugą grupę. Prawie wszystkie współczynniki chromatograficzne: PC1, PARAFAC1, logPexp, KOWWIN i AcLogP wykazały również podobieństwa, stając się wyraźnym lewym klastrem. Reszta indeksów (prawy klaster) składa się z innych współczynników obliczeniowych i chromatograficznych wyznaczonych z użyciem adsorbentu $-NH_2$.

Uzyskane dane potwierdzają wcześniejsze stwierdzenie, że metodami obliczeniowymi otrzymujemy wyniki mniej dokładne w procesie przewidywania lipofilowości niż wyznaczonymi eksperymentalnie.



Rysunek 7. Analiza skupień miar lipofilowości z odległością Euklidesa jako miarą podobieństwa

Techniki chromatograficzne, zwłaszcza w odwróconym układzie faz dobrze odzwierciedlają zachowanie (podział) składnika w układzie faz oktanol/woda i mogą być uważane za najlepszą opcję w wyznaczaniu lipofilowości.

Omówione powyżej, kompleksowe badania retencji na przykładzie wybranych cefalosporyn przeprowadzone z użyciem różnych faz stacjonarnych wykazały ich podobne zachowanie na fazach stacjonarnych RP-18, RP-8 i -CN. Określone korelacje między wynikami otrzymanymi doświadczalnie a niektórymi obliczonymi wskaźnikami lipofilowości wykazały, że wartości R_{M0} i $PC1/R_M$ są najbardziej adekwatnymi parametrami lipofilowości badanych związków. Ponadto płytki RP-8, -CN i RP-18 są odpowiednimi fazami stacjonarnymi do badań tej grupy związków. Natomiast techniki obliczeniowe nadal nie spełniają wszystkich wymaganych warunków, nie mogą więc w pełni zastąpić eksperymentu.

[H4] *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, Biomedical Chromatography, 2015, 29, 388–395*

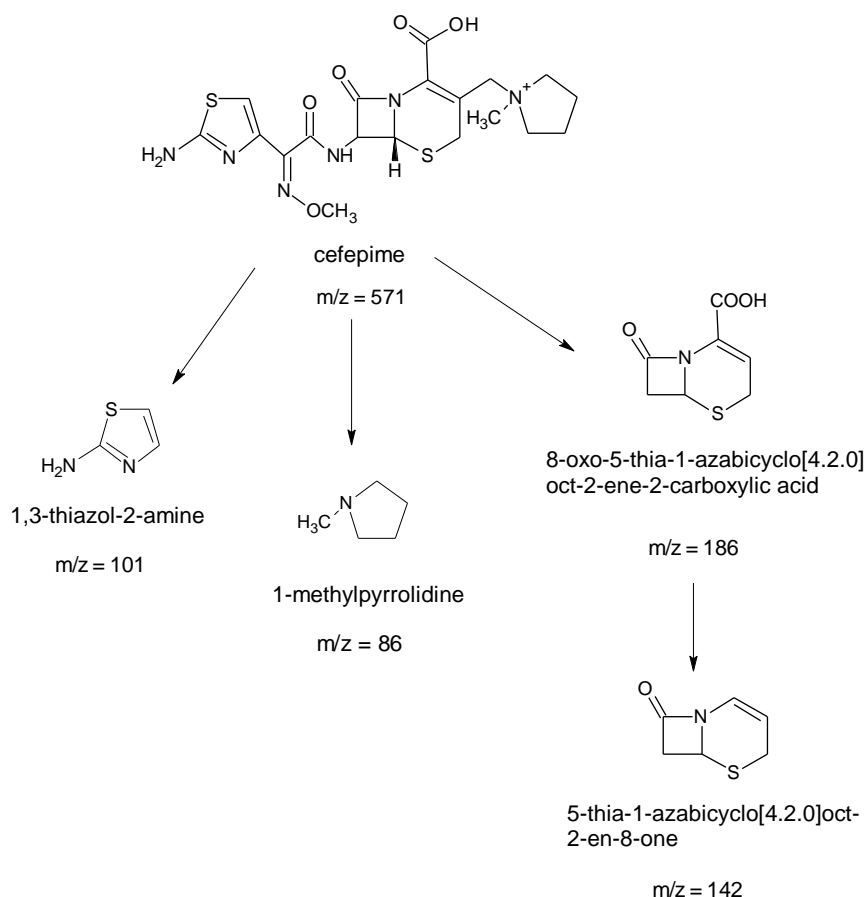
Wprowadzenie do obiegu cefalosporyn czwartej generacji takich jak cefepim kieruje zainteresowania badaczy w stronę poszukiwania jak najlepszych metod oznaczania ilościowego oraz analizy ich właściwości. W dostępnym piśmiennictwie do oznaczania zawartości i badania stabilności cefepimu w różnych matrycach najczęściej wykorzystywane są metody chromatografii cieczowej (HPLC) [55-58], metody spektroskopowe (FT-IR, NMR, MS) [59], spektrofotometryczne [60], strefowej elektroforezy kapilarnej [61] oraz elektrochemiczne [62]. Metoda TLC, pomimo wielu zalet, nie znalazła dotychczas zastosowania do analizy jakościowej i ilościowej cefepimu.

Celem omawianej pracy było opracowanie szybkiej, selektywnej i powtarzalnej metody oznaczania cefepimu w preparatach farmaceutycznych, spełniającej wymagania ICH [63]. Przeprowadzono proces optymalizacji warunków analizy uzyskując dobry rozdział składników stosując jako fazę stacjonarną płytki pokryte żelem krzemionkowym TLC F₂₅₄ oraz mieszaninę o składzie: etanol + 2-propanol + lodowy kwas octowy (99.5%) + woda (4:4:1:3, v/v/v/v) jako fazę ruchomą. Densytometryczną detekcję prowadzono przy długości fali $\lambda = 266$ nm. Następnie metodę zwalidowano uzyskując wysoką dokładność (99,24–101,37%) i precyzję (RSD 0,06–0,36%) oznaczeń w zakresie liniowości 0,5–6,0 $\mu\text{g/plamkę}$. Niskie wartości LOD i LOQ (odpowiednio 0,16 i 0,50 $\mu\text{g/plamkę}$) wskazały wysoką czułość metody. Otrzymane wyniki walidacji potwierdziły możliwość zastosowania opracowanej procedury chromatograficzno-densytometrycznej do rutynowych oznaczeń analitycznych.

W dalszym etapie badań sprawdzono wpływ środowiska (pH i temperatury) oraz czasu inkubacji na szybkość procesu degradacji cefepimu. Rozkład przeprowadzono w środowisku obojętnym, kwasowym (kwas solny o stężeniach 0,1, 0,5 i 1,0 mol/L) i zasadowym (roztwór wodorotlenku sodu o stężeniach 0,0001, 0,001 i 0,01 mol/L) w temperaturze 22, 60 i 90°C. Na zarejestrowanych densytogramach stwierdzono obecność dodatkowego piku o wartości współczynnika opóźnienia $R_F \approx 0,89$, obok piku pochodzącego od cefepimu ($R_F \approx 0,21$). Powstały produkt różnił się widmem absorpcji od widma substancji aktywnej. Obliczono parametry charakteryzujące rozdzielczość R_s (8,24) i α (30,44); otrzymane wartości gwarantują dobrą separację badanych składników.

Uzyskane wyniki obliczeń parametrów kinetycznych i termodynamicznych pozwoliły stwierdzić, że rozkład cefepimu zachodzi zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Wyznaczone parametry $t_{0.5}$ i $t_{0.1}$ potwierdziły większą stabilność cefepimu w środowisku kwasowym niż zasadowym. Wartości energii aktywacji (E_a) mieściły się w zakresie od 2,87 do 5,19 kJ/mol·K w roztworach o charakterze kwasowym (1–0,1 mol/L HCl) oraz od 1,92 do 5,77 kJ/mol·K w zasadowym (0,01–0,1 mol/L NaOH).

W celu zidentyfikowania powstającego produktu degradacji, bezpośrednio z chromatogramów rejestrowano wartości R_F i widma UV dla wszystkich składników oraz przeprowadzono analizę HPLC-MS/MS analizowanych roztworów. Bazując na uzyskanych wynikach zasugerowano prawdopodobny mechanizm degradacji cefepimu.



Rysunek 8. Prawdopodobna reakcja degradacji cefepimu w środowisku kwasowym, ustalona na podstawie widm MS

Na podstawie przeprowadzonych analiz i uzyskanych wyników można stwierdzić, że opracowana nowa metoda TLC jest szybka, selektywna, precyzyjna i dokładna; może być stosowana w rutynowej analizie preparatów farmaceutycznych oraz laboratoriach kontroli jakości z dużą łatwością i elastycznością a prostota wykonania przekłada się na oszczędność czasu i kosztów. W szczególności metoda ta pozwala na selektywne oznaczanie analitu bez wpływu składników matrycy na wynik; może być więc z powodzeniem stosowana do oznaczania cefepimu w różnych warunkach. Potwierdzono, że w środowisku kwasowym następuje wolniejsza degradacja badanego antybiotyku niż w środowisku zasadowym, jest ona znacząco zależna od temperatury i czasu inkubacji. Na podstawie zarejestrowanych chromatogramów oraz widm absorpcji (HPLC-MS/MS, TLC z detekcją densytometryczną) wykazano, że głównym produktem rozkładu cefepimu może być 1-metylopirolidyna.

[H5] Dąbrowska M., Starek M., Opoka W., *Comprehensive study of the stability of cefepime hydrochloride and cefuroxime axetil under various environmental conditions*, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2016, 29, 264–272

Odmienna fotoreaktywność związków wynikająca z różnic w budowie strukturalnej, jak również różne efekty fototoksyczne obserwowane zarówno *in vivo* jak i *in vitro* stanowią ciągły obiekt zainteresowań naukowców potwierdzany licznymi

pracami [64,65]. Niektóre związki chemiczne mogą ulegać rozkładowi w niewielkim stopniu nawet po wielu tygodniach ekspozycji, inne natomiast mają fotochemiczny czas połowicznego rozkładu rzędu zaledwie kilku minut. Problematyka fotostabilności nie jest zagadnieniem prostym w porównaniu do stabilności termicznej; charakteryzuje ją ogromna złożoność mechanizmów zachodzących reakcji oraz interpretacji wyników [66]. Temat ten jest tym bardziej skomplikowany jeżeli weźmie się pod uwagę fakt możliwych interakcji substancji leczniczych; czystość i stabilność substancji stanowią niezbędny warunek wstępny podczas opracowywania form dawkowania czy przechowywania [67]. W dostępnym piśmiennictwie nie odnotowano prac dotyczących badania stabilności estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu w obecności jonów metali, których obecność może indukować u pacjenta interakcje, zwłaszcza podczas złożonego leczenia medycznego.

W prezentowanej pracy przedstawiono badania fotodegradacji wybranych cefalosporyn, cefepimu i estru acetoksyetylowego cefuroksymu, w rozpuszczalnikach o różnej polarności (metanol i aceton) w obecności wybranych jonów metali (Cu(II), Fe(II), Fe(III), Co(II), Mn(II) i Ni(II)) podczas naświetlania promieniowaniem UV-C.

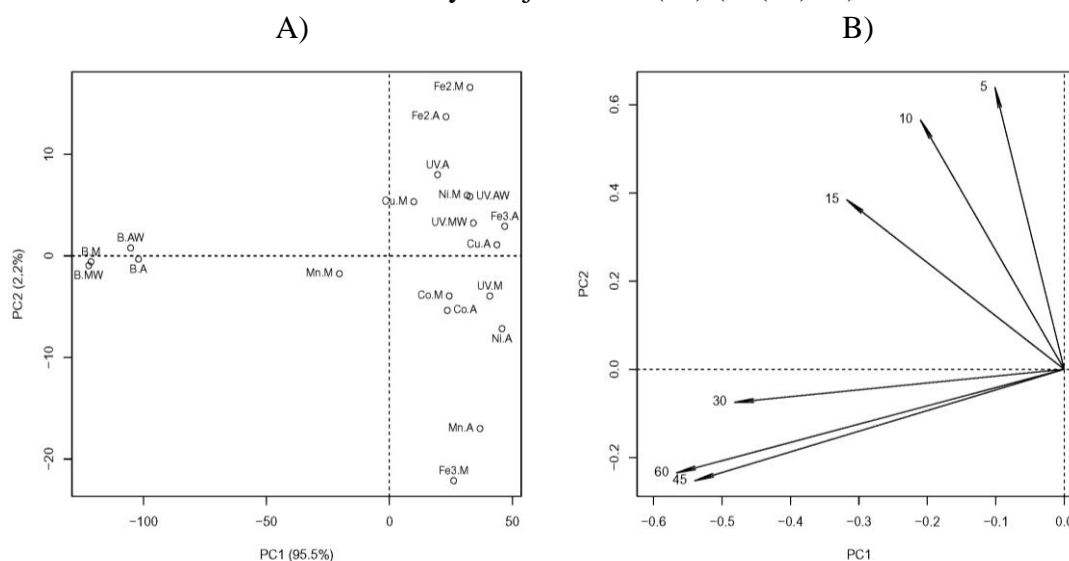
Do badań wybrano metale występujące w wielu, powszechnie stosowanych suplementach diety, które mogą być spożywane podczas terapii cefalosporynami. Badania przeprowadzono metodą TLC z detekcją densytometryczną [H4,68], a do analizy uzyskanych wyników wykorzystano metody chemometryczne.

Procent rozkładu cefalosporyn podczas ekspozycji na promieniowanie UV-C zarejestrowano już po 5 minutach od rozpoczęcia eksperymentu, który wynosił ok. 10% dla chlorowodoru cefepimu w roztworze wodno-metanolowym i około 25% w przypadku estru acetoksyetylowego cefuroksymu w wodzie z acetonem. Szybkość degradacji wzrastała podczas dalszego napromieniowania, osiągając 90% dla estru acetoksyetylowego cefuroksymu po 1 h, w roztworach wodno-metanolowych.

Badane cefalosporyny ulegały degradacji z różną szybkością, zgodnie z kinetyką reakcji pierwszego rzędu. Obecność jonów Fe(III) w roztworach wodno/acetonowych cefepimu skutkowałą zwiększeniem szybkości reakcji (stała szybkości reakcji k w zakresie od 3,22 do 10,50 [h⁻¹]), natomiast w obecności jonów Cu(II) k osiągnęła wartość 12,32 [h⁻¹]. Stałe szybkości reakcji wyznaczone dla wodno-acetonowych roztworów cefepimu maleją w kolejności: Fe(III) > Ni(II) > Cu(II) > Fe(II) > Co(II) > Mn(II), podczas gdy dla roztworów wodno-metanolowych prezentują się następująco: Fe(II) > Ni(II) > Co(II) > Cu(II) > Fe(III) > Mn(II). Największą fotostabilność estru acetoksyetylowego cefuroksymu stwierdzono w obecności jonów Mn(II), Fe(III), Ni(II), Co(II) i Fe(II). Zaobserwowany wpływ jonów metali na rozkład antybiotyków i ich zróżnicowany udział w procesie degradacji cefalosporyn można tłumaczyć złożoną aktywnością poszczególnych jonów metali w reakcji z cefalosporynami, co prowadzi do powstania mniej lub bardziej trwałych połączeń podatnych na rozkład pod wpływem promieniowania.

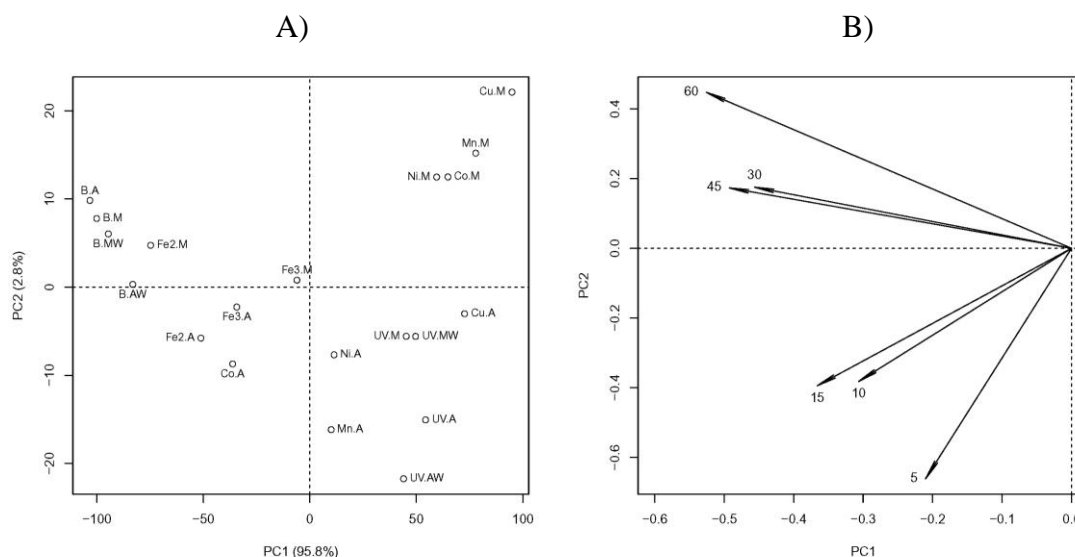
Uzyskane eksperymentalnie wyniki poddano następnie analizie chemometrycznej. Profile degradacji rozmieszczono w matrycy (20 próbek x 6 punktów czasowych) i poddano analizie PCA. W przypadku chlorowodoru cefepimu 95% różnic było związane ze średnim stężeniem (siła rozkładu leku w poszczególnych

środowiskach, Rys. 9A). Ślepe próby tworzyły odrębne skupienie z PC1 i PC2 bliskimi zera. Pozostałe próbki utworzyły drugi klaster, jednakże nie uformowały żadnej zależności od rodzaju rozpuszczalnika lub jonu metalu. Wykres PC1 vs PC2 obrazuje, że proces degradacji był indukowany jedynie przez promieniowanie UV, a rola metalu była drugorzędna. W przypadku PC2 (2,2% wariancji) pojawiające się różnice związane były z profilem przebiegu procesu degradacji. Wysokie PC2 (Rys. 9B) wskazuje na stosunkowo wysokie stężenie leku na początku degradacji i większą degradację w czasie z wyjątkiem jonów Fe(III) w roztworze metanol-woda (Fe(III).M) i roztworach aceton-woda naświetlanych bez udziału metalu (UV.A). Niska wartość PC2 wskazuje przeciwne zachowanie w przypadku roztworów z jonami Mn(II) w obu środowiskach (Mn(II).A, Mn(II).M), z jonami Ni(II) w roztworach aceton-woda (Mn(II).A i Ni(II).A) i roztworach w metanolowo-wodnych z jonami Fe(III) (Fe(III).M).



Rysunek 9. Analiza PCA profili degradacji chlorowodoru cefepimu A – wartości składowych głównych, B – wektory obciążeń, (B – ślepa próba, UV – naświetlanie bez udziału metalu, A – aceton, M – metanol, W – mieszanina z wodą)

Dla drugiego antybiotyku, estru acetoksyetylowego cefuroksymu, analiza PCA wskazuje podobne zachowanie do wcześniejszej i wyjaśnia odpowiednio 95,8% i 2,8% całkowitej wariancji (Rys. 10A). W przeciwieństwie do chlorowodoru cefepimu, próbki nie tworzą odrębnego skupienia, ale wypukły trend. Próbki z jonami Fe(II) oraz Fe(III) ulegają wolniej degradacji, a równocześnie największy rozkład występuje w obecności jonów Mn(II) i Ni(II). Można zatem stwierdzić, że w tym przypadku rodzaj rozpuszczalnika i jonu metalu są znaczące (w górnej prawej części wykresu punktacji i dolnej części prawej znajdują się dwa klastry) estru acetoksyetylowego cefuroksymu i stanowią istotne czynniki wpływające na rozkład. Interpretacja PC2 daje odmienne wnioski; naświetlane próbki antybiotyku bez dodatku metalu ulegają rozkładowi wolniej niż próbki z dodatkiem jonów metali (Rys. 10B). W wyniku przeprowadzonej analizy można stwierdzić, że degradacja estru acetoksyetylowego cefuroksymu zachodzi najwolniej w obecności jonów żelaza bez względu na zastosowany rozpuszczalnik, przy czym analogiczne zachowanie nie jest obserwowane w przypadku chlorowodoru cefepimu.



Rysunek 10. Analiza PCA profili degradacji estru acetoksyetylowego cefuroksymu: A – wartości głównych składowych, B – wektory obciążeń

Objaśnienia: B – ślepa próba, UV – naświetlanie bez udziału metalu, A – aceton, M – metanol, W – mieszanina z wodą

Podsumowując można stwierdzić, że fotodegradacja chlorowodoru cefepimu zachodzi mniej intensywnie w obecności jonów metali (z wyjątkiem Fe(III) i Fe(II)) w przeciwieństwie do roztworów nie zawierających jonów metali. W roztworach wodno-metanolowych zawierających ester acetoksyetylowy cefuroksymu i jony Cu(II) zachodzi szybsza degradacja w porównaniu z analogicznymi roztworami zawierającymi pozostałe jony metali, bez jonów metali czy w roztworach acetonowych/wodnych. Uzyskane eksperymentalne wyniki oraz analiza trendów metodą PCA dostarczyły istotnych informacji na temat stabilności chlorowodoru cefepimu i estru acetoksyetylowego cefuroksymu, co może być istotne zwłaszcza z punktu widzenia bezpośredniej terapii, biorąc pod uwagę bezpieczeństwo pacjenta podczas równoczesnego stosowania suplementów diety zawierających jony metali w trakcie leczenia cefalosporynami.

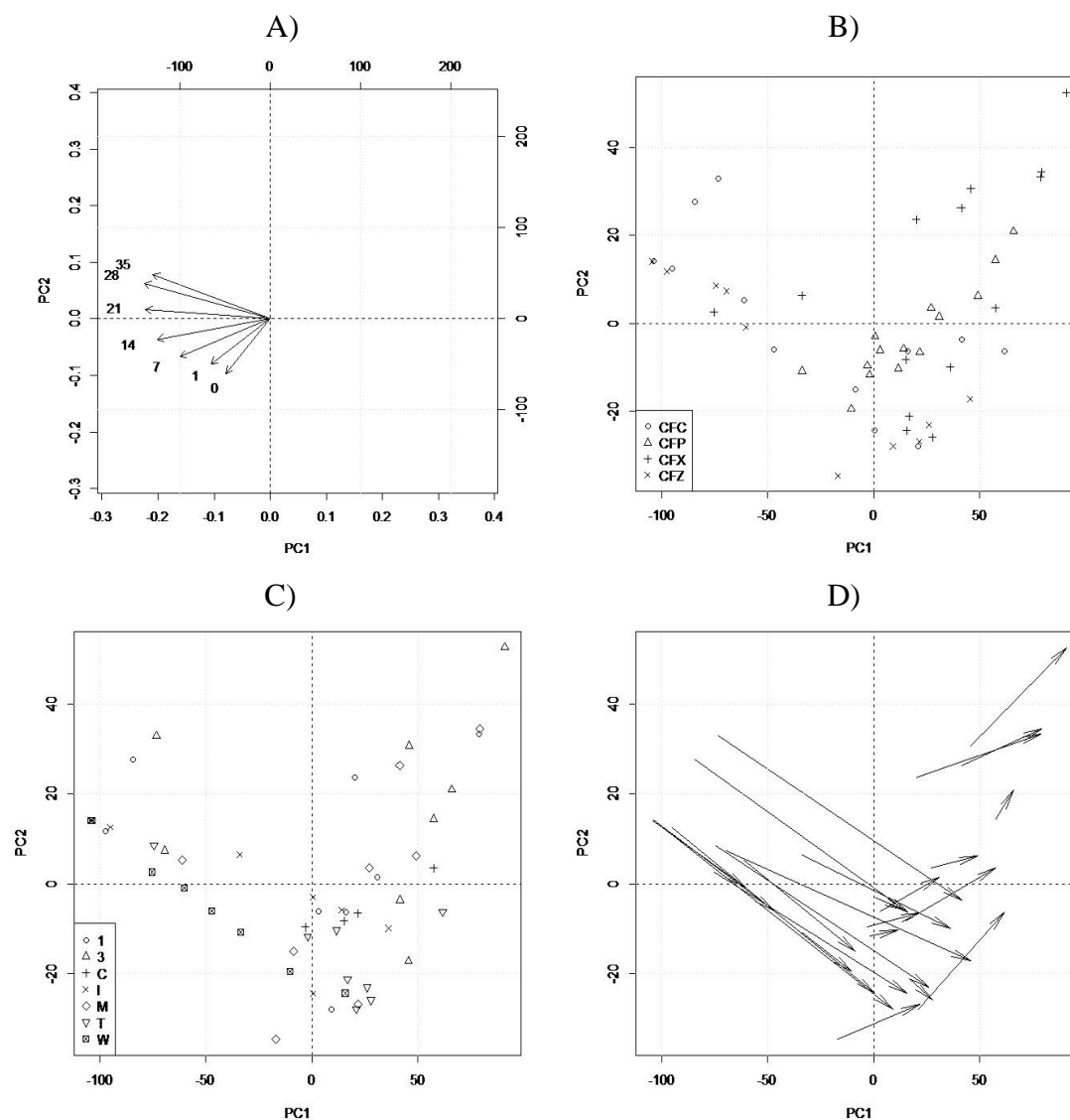
[H6] Dąbrowska M., Komsta Ł., Opoka W., Starek M., *Chemometric analysis of chromatographic data in stability investigation of cephalosporins*, *Acta Chromatographica*, DOI: 10.1556/1326.2017.00341

Pojawianie się opornych na antybiotyki patogenów bakteryjnych zmusza badaczy do dokładnego poznania mechanizmów związanych z działaniem leków i wykorzystywania tej wiedzy w celu zwiększenia skuteczności działania już istniejących. Badania prezentowane w piśmiennictwie donoszą, że wiele antybiotyków zawdzięcza (co najmniej częściowo) swoje letalne skutki stresowi oksydacyjnemu i szkodom powstającym w organizmie a wynikającym z współwytworzenia przez antybiotyki reaktywnych form tlenu [69,70]. Niektórzy autorzy twierdzą, że ditlenek diwodoru może wywołać globalną odpowiedź stresową, dlatego jego stosowanie może skutkować opornością na antybiotyki działające na różne procesy komórkowe [71-74].

Zaobserwowano ponadto, że zwiększenie produkcji endogennych utleniaczy w celu wzmocnienia aktywności znanych antybiotyków może stać się nową strategią terapeutyczną.

Celem zaprezentowanych w pracy badań było ustalenie kinetyki reakcji degradacji wybranych cefalopsoryn (przedstawicieli różnych generacji): cefazoliny, cefakloru, estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu w roztworach wodnych, w obecności czynników redoks tj. roztwór jodu, manganianu(VII) potasu, ditlenku diwodoru, tiosiarczanu(VI) sodu i kwasu askorbinowego, w funkcji temperatury (22 i 36°C). Analizę zmian stężeń antybiotyków w trakcie eksperymentu prowadzono wykorzystując wcześniej opracowane i zwalidowane metody chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną, cechujące się prostotą i szybkością wykonania oraz czułością i rzetelnością otrzymanych wyników [75,76]. W procesie optymalizacji warunków pod kątem badań przeanalizowano wiele zmiennych tj. stężenie analizowanych antybiotyków oraz użytych czynników redoks, a także wpływ czasu i temperatury. Procesy degradacji poszczególnych cefalosporyn opisane zostały przez odpowiednie parametry kinetyczne (k , $t_{0,1}$, $t_{0,5}$). Uzyskano liniowe korelacje ($r > 0,98$) co pozwoliło stwierdzić, że reakcje te postępują zgodnie z kinetyką pierwszego rzędu. Wartości stałych szybkości mieściły się w zakresie od $3,58 \cdot 10^{-4}$ [h⁻¹] dla cefakloru do $6,00 \cdot 10^{-3}$ [h⁻¹] dla cefepimu w temperaturze pokojowej, natomiast w 36°C, w zakresie od $6,31 \cdot 10^{-3}$ [h⁻¹] dla cefakloru do $1,12 \cdot 10^{-2}$ [h⁻¹] dla estru acetoksyetylowego cefuroksymu.

W celu analizy zależności pomiędzy stabilnością leków a zmiennymi warunkami stresowymi, bazując na otrzymanych parametrach kinetycznych (k , $t_{0,1}$, $t_{0,5}$), przeprowadzono ich analizę wykorzystując metody chemometryczne. PCA została przeprowadzona na macierzy o wymiarach 7 x 50 (punkty czasowe x krzywe rozkładu, tj. kombinacje leku, czynnika degradującego i temperatury). Wykazano, że 84,61% wariacji znajdowało się w pierwszej głównej składowej, podczas gdy 11,84% w drugiej. Biorąc pod uwagę, że ponad 96% wariacji wyjaśniono dwiema głównymi składowymi, można stwierdzić, że zestaw danych jest łatwy do kompresji, a prawie całość informacji może być wyrażona jako dwa oddzielne trendy ortogonalne. Analizując wartości wektorów obciążeń (Rys. 11A) można zauważyć, że wartości procentowe po 35 dniach są niezwiązane z wartościami otrzymanymi na początku reakcji degradacji. Kolejne punkty były jednak wzajemnie ze sobą powiązane, a wektory kolejnych punktów czasowych tworzyły charakterystyczny wachlarz. Z tego względu, największe źródło wariacji (PC1) można wyrazić jako średnią wrażliwość na rozkład (średnia wartość leku podczas degradacji). Niewielka wartość PC1 jest związana ze słabym rozkładem, podczas gdy duże wartości odpowiadają znacznej degradacji. Natomiast PC2 jest związana z różnicami kształtu krzywej. Mała wartość PC2 wskazuje na słaby rozkład w ciągu pierwszych 14 dni, z następującą później szybką degradacją. Z kolei wysoka wartość PC2 wiąże się z nagłą degradacją w pierwszych dniach, a ostatnie trzy punkty czasowe nie wykazują już tak szybkich zmian.



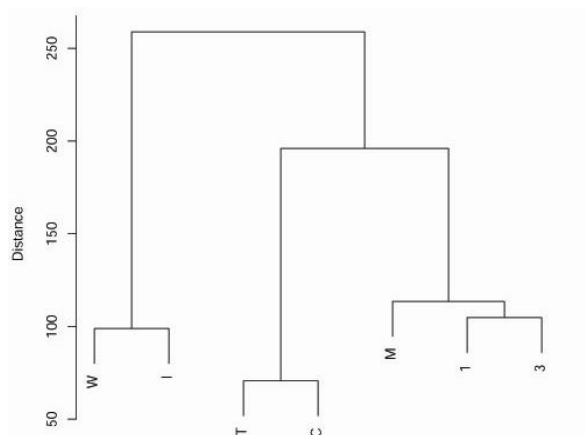
Rysunek 11. Wektory obciążeń (A) i główne składowe (B-D) pierwszych dwóch składowych analizy PCA krzywych degradacji

(A) krzywe oznaczone względem badanych leków, (B) krzywe oznaczone względem czynników redoks. Przesunięcia w zredukowanej przestrzeni pomiędzy próbkami w temperaturze 22 i 36°C oznaczone jako wektory (C). Skróty: '1' – 0,1% ditlenek diwodoru, '3' – 0,3% ditlenek diwodoru, 'C' – kwas askorbinowy, 'I' – roztwór jodu, 'M' – manganian(VII) potasu, 'T' – tiosiarczan(VI) sodu, 'W' – woda, 'CFC' – cefaklor, 'CFP' – cefepim, 'CFX' – cefuroksym, 'CFZ' – cefazolina

Analizując wyniki PCA (Rys. 11B, 11C) można stwierdzić, że przyjmują one pewną krzywoliniową postać w zredukowanej przestrzeni. Krzywe dla średniej wielkości całkowitej degradacji mają niską wartość PC2, tzn. proces zaczyna się powoli. I odwrotnie, krzywe z najniższą i najwyższą degradacją mają wysokie wartości PC2, co oznacza, że ulegają szybkiej degradacji w początkowym etapie badanego procesu. Oceniając wartości głównych składowych w stosunku do zastosowanego antybiotyku (Rys. 11B) można stwierdzić, że nie ma ścisłego zgrupowania krzywych należących do konkretnych cefalosporyn. Zaobserwowano jedynie niewielkie przesunięcie dla cefepimu (trójkąty) w kierunku wysokich wartości PC1. Natomiast wyraźne i widoczne tendencje zaobserwowano, gdy oceniano główne składowe względem czynników

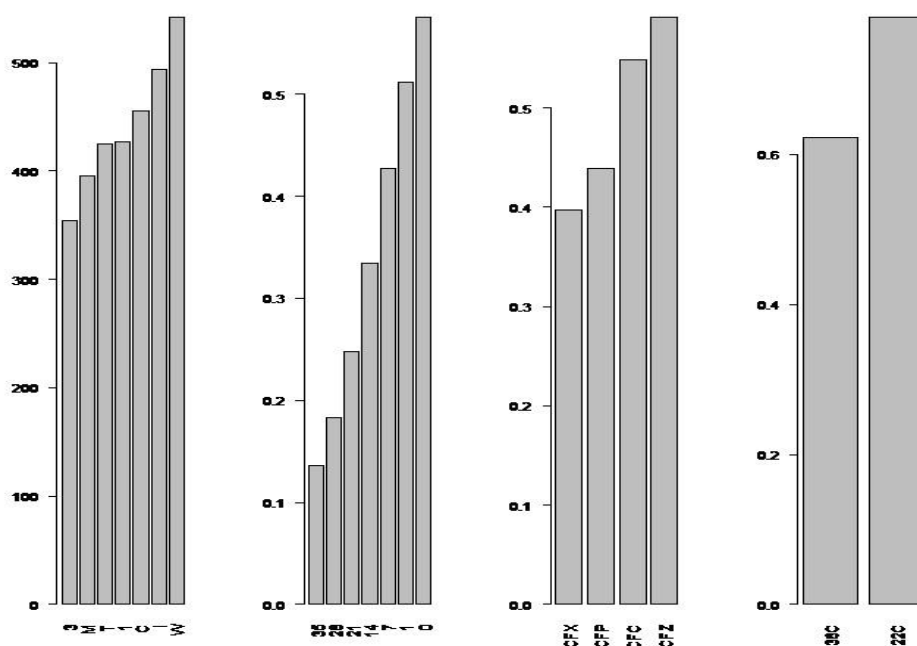
redoks (Rys. 11C). Szybki i duży stopień degradacji jest obserwowany tylko w przypadku silnych utleniaczy (dinitlenek diwodoru w obu stężeniach, manganian(VII) potasu) (prawa górna część wykresu). Roztwory wodne bez dodatku czynnika redoks były lokowane na lewym “ramieniu” trendu (litery “V”), podobnie jak próbki zawierające roztwór jodu. Tiosiarczan(VI) sodu i kwas askorbinowy powodowały widoczną degradację antybiotyków w stosunku do roztworów wodnych oraz zawierających roztwór jodu (umiarkowanie wysoki PC1), jednak różniły się od wartości PC2 ze względu na wolny początek reakcji rozkładu. Interesującej informacji dostarcza Rys. 11D, gdzie przesunięcia między próbkami oznaczono jako wektory (od 22 do 36°C). Można stwierdzić, że w przypadku próbek, w których zachodziła najwolniejsza degradacja zaobserwowano znaczny jej wzrost ze wzrostem temperatury. Natomiast gdy rozkład zachodził ze średnią szybkością (prawe ramię trendu), wzrost szybkości nie był tak duży, jakkolwiek powiązany ze wzrostem PC1 i podążał wzdłuż drogi w kształcie „V”.

W celu wizualizacji podobieństwa użytych czynników redoks, zestaw danych został przekształcony w macierz o wymiarach 7 x 56 (reagent x różne kombinacje leków, czas i temperatura). Analizując wyniki HCA w oparciu o odległość Euklidesową (Rys. 12) stwierdzono, że reagenty są skupione względem ich chemicznego sposobu działania (reakcje utleniania lub redukcji), równocześnie odosobnioną grupę stanowiły próbki zawierające roztwór jodu oraz nie zawierające czynnika redoks.



Rysunek 12. Dendrogram Euklidesowy pokazujący podobieństwa pomiędzy reagentami

Cały zestaw danych, rozmieszczony jako tablica czterolinearna o wymiarach 7 (czynniki) x 7 (punkty czasowe) x 4 (leki) x 2 (temperatury) poddano również analizie PARAFAC. Wykazano, że model jednofaktorowy wyjaśnia 92% wariacji i wystarcza do modelowania tego zestawu danych (Rys. 13).



Rysunek 13. Składowe analizy PARAFAC

Z uwagi na to, że wartości składowych opierają się na wartościach procentowych, niższa wartość wskazuje na silniejszą degradację. Analizą PARAFAC potwierdzono wcześniejszy wniosek, że rozkład cefalosporyn w temperaturze 36°C jest zdecydowanie większy. Najbardziej stabilnym lekiem jest cefazolina, podczas gdy najmniej stabilnym ester acetoksyetylowy cefuroksymu. Punkty czasowe reprezentowały trend niemal liniowy. Woda i roztwór jodu mają najmniejszą zdolność do rozkładu cefalosporyn, podczas gdy manganian(VII) potasu i 0,3% ditlenek diwodoru wykazywały najsilniejszą zdolność do degradacji badanych leków.

Podsumowując, przeprowadzone analizy uzyskanych chromatograficznie wyników można z pewnością stwierdzić, że stopień degradacji badanych cefalosporyn zależy zarówno od temperatury jak i od obecności w roztworze czynników redoks.

[H7] *Dąbrowska M., Starek M., Opoka W., Determination of cefuroxime axetil and cefepime in biological material by TLC-densitometry, JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2017, 30, 291–298*

W piśmiennictwie istnieją różne metody analityczne służące do monitorowania poziomu estru acetoksyetylowego cefuroksymu lub cefepimu w różnych matrycach. Większość z nich opiera się na zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją UV [77-80]. Wśród obecnie dostępnych technik chromatografia cieczowa połączona ze spektrometrią mas (LC/MS oraz LC/MS/MS) są dobrymi narzędziami analitycznymi do ilościowego oznaczania leków, w tym cefalosporyn, także w złożonej matrycy biologicznej [81-83]. Charakteryzują się one wysoką czułością i selektywnością oznaczeń, jednakże wymagają dużego nakładu pracy na etapie przygotowania próbki.

Tematyka badań jakościowych i ilościowych leków w różnych matrycach, takich jak preparaty farmaceutyczne lub materiał biologiczny, stanowi istotny element analizy w dziedzinie badań farmaceutycznych, klinicznych i analizy sądowej. Opracowanie prostej, dokładnej i selektywnej metody oznaczania antybiotyków w płynach ustrojowych wydaje się być więc zasadne i celowe. Chromatografia cienkowarstwowa w połączeniu z detekcją densytometryczną spełnia te wymagania. Technika ta jest szybkim, powtarzalnym i łatwym narzędziem do wykorzystania w rutynowych badaniach. Może być z powodzeniem stosowana w laboratorium klinicznym do monitorowania poziomu leków, a jej dodatkową zaletą jest możliwość wykorzystania do analizy przesiewowej kilku leków równocześnie.

Celem podjętych badań było opracowanie metody TLC z detekcją densytometryczną do oznaczania cefalosporyn (używając jako związków modelowych estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu) w płynach ustrojowych (w ludzkiej krwi pełnej lub moczu), którą można będzie wykorzystać w badaniach klinicznych czy farmakokinetycznych.

Proces ekstrakcji estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu oraz jednoczesnej izolacji elementów matrycy (pełnej krwi i moczu człowieka) przeprowadzono stosując dwa rozpuszczalniki różniące się polarnością, metanol lub aceton (siła elucyjna metanolu $\epsilon^\circ \sim 0,95$, acetonu $\sim 0,56$). Analizę przeprowadzono na płytkach TLC (żel krzemionkowy 60F₂₅₄) stosując jako fazy ruchome mieszaniny: chloroform + octan etylu + lodowaty kwas octowy + woda (4:4:1:3, v/v/v/v) do oznaczania estru acetoksyetylowego cefuroksymu oraz etanol + 2-propanol + lodowaty kwas octowy + woda (4:4:1:3, v/v/v/v) dla cefepimu. Położenie plam na chromatogramach rejestrowano densytometrycznie przy długości fali $\lambda = 285$ nm (ester acetoksyetylowy cefuroksymu) i 266 nm (cefepim). Procedura optymalizacji oprócz ustalenia warunków ekstrakcji i rozdzielania, dotyczyła także określenia stosunku ilości substancji oznaczanej do objętości krwi lub moczu. Stwierdzono, że w ustalonych warunkach analizowane cefalosporyny są dobrze rozdzielone od składników matrycy, a wydajność ekstrakcji wynosi $\sim 100\%$.

Następnie oceniono opracowaną metodę zgodnie z wytycznymi ICH, określając jej selektywność, swoistość, liniowość, granicę wykrywalności (LOD) i oznaczalności (LOQ), precyzję i dokładność [63]. Piki pochodzące od substancji czynnej i wyekstrahowanych składników matrycy były symetryczne, dobrze wykształcone i nie interferowały ze sobą, co potwierdzono wyznaczając parametry rozdzielania R_s (odpowiednio od 3,43 do 8,42 dla estru acetoksyetylowego cefuroksymu i 3,57 do 5,14 dla cefepimu) i α (od 4,36 do 14,38 dla estru acetoksyetylowego cefuroksymu i 3,47 do 5,20 dla cefepimu). Można więc stwierdzić, że metoda jest selektywna i specyficzna względem badanych antybiotyków i pozwala w prosty sposób uzyskać ich dobry rozdział od składników złożonej matrycy. Zakres liniowości metody mieści się w granicach 2,72–38,08 $\mu\text{g/mL}$ dla estru acetoksyetylowego cefuroksymu i 6,89–38,58 $\mu\text{g/mL}$ dla cefepimu. Uzyskano także dobrą korelację wyników ($r \sim 0,99$) pomiędzy oznaczonym a przewidywanym stężeniem analitu. Przeprowadzona dodatkowo analiza reszt każdego z analitów nie wykazała żadnych trendów ($r < 1 \cdot 10^{-5}$), co potwierdza liniowość zakresu roboczego metody. Wartości LOD i LOQ

dla badanych leków w obu eluentach mieściły się w zakresie od 0,04 do 0,47 $\mu\text{g}/\text{plamk}$. Precyzję wyrażono jako wartość współczynnika zmienności (% RSD) uzyskując wartości precyzja bezpośredniej w zakresie od 0,71 do 1,60%, natomiast precyzji pośredniej od 0,99 do 1,55%. Otrzymane wartości RSD były mniejsze niż 2%, co gwarantuje uzyskanie prawidłowych wyników. Podobne wartości (RSD poniżej 1,29%) uzyskano określając dokładność metody (procent odzysku w zakresie od 95 do 101%).

Opracowana szybka, precyzyjna i selektywna chromatograficzna metoda umożliwia analizę ilościową estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu w próbkach osocza i moczu. Uzyskane parametry wykazały dobrą separację analizowanych związków z użyciem płytek pokrytych żelom krzemionkowym w wybranych fazach ruchomych. W dalszym etapie opracowana metoda została z powodzeniem zastosowana do oznaczania antybiotyków w matrycy biologicznej. Ustalona procedura pozwala analizować próbki surowicy i osocza w szerokim zakresie stężeń estru acetoksyetylowego cefuroksymu i cefepimu. Przedstawiona metodyka jest prostsza niż metody alternatywne, równocześnie cechuje się wystarczająco dużą precyzją i dokładnością. Na tej samej płytce chromatograficznej można równocześnie oznaczyć wiele próbek wobec wzorców w identycznych warunkach, co prowadzi do uzyskania dobrej stabilności i precyzji oznaczeń. Ponadto pozwala to zaoszczędzić materiały i rozpuszczalniki oraz skrócić czas analizy. Procedura ta może być z powodzeniem stosowana w analizach badanych związków w laboratoriach i zakładach farmaceutycznych, w kontroli jakości leku. Prostota i szybkość wykonania eksperymentu przekłada się na oszczędność czasu, co jest szczególnie istotne w diagnostyce i monitorowaniu przebiegu leczenia pacjentów.

3.2.4. Podsumowanie wyników badań stanowiących podstawę habilitacji

W przedstawionych publikacjach stanowiących podstawę osiągnięcia naukowego przeanalizowałam dotychczasowe rozwiązania stosowane do wyznaczenia parametrów lipofilowości, jak również wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań chromatograficznych w zakresie wyznaczania parametrów retencji ($R_{M0} = \log P$), charakteryzujących właściwości fizykochemiczne związków chemicznych z grupy antybiotyków cefalosporynowych. Dane eksperymentalne, uzyskane metodą TLC oraz HPLC z wykorzystaniem kolumny IAM, porównałam z parametrami wyznaczonymi metodami obliczeniowymi (przy użyciu różnych algorytmów matematycznych), wartościami uzyskanymi metodą 'shake-flask', budową oraz aktywnością (wyrażoną jako MIC) cefalosporyn objętych planem badań. Do oceny podobieństw, różnic i ewentualnych powiązań pomiędzy analizowanymi parametrami wykorzystałam metody chemometryczne (HCA, PCA, PARAFAC) stanowiące odpowiednie narzędzie do analizy danych, dotychczas stosunkowo rzadko stosowane w połączeniu z TLC. Chemometrię zastosowałam także do analizy wyników uzyskanych chromatograficznie, a dotyczących badań stabilności wybranych cefalosporyn w warunkach stresowych (pH, temperatura, promieniowanie UV) oraz w obecności jonów metali i czynników redoks w zmiennym czasie inkubacji. Wykorzystanie technik chemometrycznych pozwoliło

na obiektywne oszacowanie i porównanie parametrów eksperymentalnych z uzyskanymi pozostałymi technikami. Ponadto, wykorzystując technikę TLC z detekcją densytometryczną przeprowadziłam optymalizację warunków chromatograficznych do analizy ilościowej cefepimu i estru acetoksyetylowego cefuroksymu w różnych matrycach. Wszystkie opracowane przeze mnie metody spełniają kryteria (liniowości, specyficzności, precyzji i dokładności) potwierdzające ich rzetelność i przydatność w analizie, zgodnie z wymaganiami ICH. Opracowane procedury w pełni pozwalają na analizę czynników wpływających na trwałość i aktywność związków.

W pracach przedstawiłam procedury, które mogą być z powodzeniem stosowane w badaniach prezentowanej grupy związków, a także nowych, potencjalnych substancji leczniczych uzyskanych poprzez modyfikacje macierzystej struktury. Metody te, uzupełnione o rzetelną analizę statystyczną mogą znaleźć zastosowanie do oceny tychże związków w laboratoriach kontroli jakości bądź laboratoriach klinicznych, w tym podczas monitorowania przebiegu terapii u pacjentów, gdzie prostota wykonania eksperymentu przekłada się na oszczędność czasu i kosztów.

Podsumowując przeprowadzone badania można sformułować następujące wnioski:

- do wyznaczenia parametrów opisujących lipofilowość cefalosporyn użytecznym narzędziem są zarówno metody chromatograficzne jak i programy obliczeniowe, mimo że istnieją pewne ograniczenia ich stosowania;
- chromatograficzny molekularny mechanizm retencji jest analogiczny w przypadku wszystkich analizowanych związków, co prawdopodobnie jest związane z ich podobną strukturą podstawową i właściwościami fizykochemicznymi;
- kompleksowa analiza retencji cefalosporyn przeprowadzona z użyciem różnych faz stacjonarnych wykazała podobne zachowanie leków na fazach stacjonarnych RP-18, RP-8 i -CN. Analizując zależności parametrów lipofilowości wyznaczone doświadczalnie i obliczeniowo stwierdzono, że R_{M0} i $PC1/R_M$ są adekwatnymi współczynnikami lipofilowości, a płytki RP-8, RP-18 i -CN są odpowiednimi fazami stacjonarnymi do badań tej grupy związków;
- uzyskane chromatograficzne parametry lipofilowości lepiej odzwierciedlają rzeczywiste właściwości fizykochemiczne badanych leków niż wartości obliczone, a metoda chromatografii cienkowarstwowej może być dobrą alternatywą w stosunku do pozostałych technik analitycznych, przy opisywaniu lipofilowego charakteru cefalosporyn. Pomimo dużego zaawansowania techniki obliczeniowe stanowią tylko pewien uproszczony model układu, który nie zastąpi eksperymentu;
- opracowane i zoptymalizowane nowe procedury chromatograficzne pozwalają na równoczesne wykonanie oznaczenia tożsamości, czystości i zawartości substancji czynnych obok ewentualnych zanieczyszczeń w preparatach farmaceutycznych i złożonych matrycach tj. materiał biologiczny. Metoda TLC jest szybka, selektywna, precyzyjna i dokładna; może być stosowana

w rutynowej analizie preparatów farmaceutycznych w laboratoriach kontroli jakości w przemyśle farmaceutycznym;

- opracowane metody pozwalają na selektywnie oznaczanie analitów bez interakcji ze składnikami matrycy, a także mogą być stosowane do oznaczania antybiotyków w warunkach stresowych. Wyznaczone wartości parametrów kinetycznych i termodynamicznych określają trwałość związków w zmiennych warunkach środowiska (pH, temperatura, promieniowanie UV, wpływ jonów metali, czynników redoks). Dzięki uzyskanym wynikom można poszerzyć dotychczasową wiedzę na temat podatności cefalosporyn na rozkład, co może być istotne zarówno z punktu widzenia technologii medycznych, jak i przy określaniu skuteczności terapii i bezpieczeństwa ich stosowania;
- bazując na wartościach współczynników opóźnienia i widmach absorpcji oraz wynikach analizy HPLC-MS/MS zaproponowano możliwą drogę degradacji cefepimu oraz zidentyfikowano główny produkt jego rozkładu;
- zastosowanie metod chemometrycznych (PCA, PARAFAC i HCA) do analizy uzyskanych eksperymentalnie wielowymiarowych danych, zarówno w analizie profili degradacji jak i w badaniach parametrów lipofilowości, pozwoliło na wyjaśnienie głównych trendów zachodzących zmian.

Bibliografia

- [1] Zaffiri L., Gardner J., Toledo-Pereyra L.H., *J. Invest. Surg.*, 2012, 25, 67–77.
- [2] Zejc A., Gorczyca M., *Chemia Leków*, PZWL, Warszawa, 2002.
- [3] Stewart J.T., Warren F.W., Johnson S.M., *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1994, 51, 801–811.
- [4] Stiles M.L., Allen L.V.Jr., Fox J.L., *Am. J. Hosp. Pharm.*, 1992, 49, 2761–2764.
- [5] Zajac M., Staniszc B., *Acta Pol. Pharm.* 1994, 51, 127–132.
- [6] Zajac M., Wojciechowska B., *Acta Pol. Pharm.*, 1994, 51, 11–14.
- [7] Kurzynoga D., Głabski T., Rusek D., *Farm. Pol.*, 2010, 66, 19–24.
- [8] Berthelot M., Jungfleisch E., *Ann. Chim. Phys.*, 1872, 4, 396–407.
- [9] Kaliszan R., Markuszewski M.J., *Studies on correlation between structure of solutes and their retention. Chemia Analityczna*, Warszawa, 2003, 48, 373–395.
- [10] Kaliszan R., *Chem. Rev.* 2007, 107, 3212–3246.
- [11] Rutkowska E., Pajak K., Józwiak K., *Acta Pol. Pharm.*, 2012, 70, 3–18.
- [12] Lipinski C.A., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 2000, 44, 235–49.
- [13] Lipiński C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Freeney P.J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 1997, 23, 3–25.
- [14] Mager D.E., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006, 58, 1326–1356.
- [15] Józwiak K., Szumiło H., Soczewiński E., *Wiad. Chem.*, 2001, 55, 1047–1073.
- [16] Polak S., Wiśniowska B., *Farm. Pol.*, 2009, 65, 214–223.
- [17] Gulyaeva N., Zaslavsky A., Lechner P., Chait A., Zaslavsky B., *J. Chromatogr. B.*, 2000, 743, 187–194.
- [18] Koufopoulou S.A., Pistos C., Giaginis C., Trantili-Kakoulidou A., *Int. J. Pharm.*, 2006, 316, 52–57.
- [19] Józwiak K., Szumiło H., Soczewiński E., *Wiad. Chem.*, 2001, 55, 1047–1072.
- [20] Valkó K.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2016, 130, 35–54.

- [21] Misztal G., Szalast A., Hopkala H., *Anal. Chem.*, 1998, 43, 357–363.
- [22] Sethi B., Soni M., Kumar S., Gupta G.D., Mishra S., Singh R., *J. Pharm. Res.*, 2010, 3, 345–351.
- [23] Tsopelas F., Vallianatou T., Tsantili-Kakoulidou A., *Expert Opin. Drug Discov.*, 2016, 11, 473–488.
- [24] Barzanti C., Evans R., Fouquet J., Gouzin L., Howath N.M., Kean G., Levet E., Wang D., Wayemberg E., Yeboah A.A., Kraft A., *Tetrahedron Lett.*, 2007, 48, 3337–3341.
- [25] Bond A.M., Marken F., *J. Electroanal. Chem.*, 1994, 372, 125–135.
- [26] Manhold R., Poda G.I., Ostermann C., Tetko V., *J. Pharm. Sci.*, 2009, 98, 861–893.
- [27] Mannhold, R., van de Waterbeemd, H., *J. Comput. Aid. Mol. Des.*, 2001, 15, 337–354.
- [28] Singh I., Juneja P., Kaur B., Kumar P., *ISRN Anal. Chem.*, 2013, 3, 13 str.
- [29] Stasiak J., Koba M., Baczek T., Bucinski A., *Med. Chem.* 2015, 11, 432–452.
- [30] Heberger K., *J. Chromatogr. A*, 2007, 1158, 273–305.
- [31] Di C.Z., Crainiceanu C.M., Caffo B.S., Punjabi N.M., *Ann. Appl. Stat.*, 2009, 3, 458–488.
- [32] Huang S.Y., Yeh Y.R., Eguchi S., *Neural Comput.*, 2009, 21, 3179–3213.
- [33] Costello A., Osborne J., *Pract. Ass. Res. Eval.*, 2005, 10, 1–9.
- [34] Ivosev G., Burton L., Bonner R., *Anal. Chem.*, 2008, 80, 4933–4944.
- [35] Wentzell P.D., Andrews D.T., Hamilton D.C., Faber K., Kowalski B.R., *J. Chemometr.*, 1997, 11, 339–366.
- [36] Daszykowski M., Walczak B., *Trends Anal. Chem.*, 2006, 25, 1081–1096.
- [37] Nasal A., Buciniński A., Bober L., Kaliszczan R., *Int. J. Pharm.*, 1997, 159, 43–55.
- [38] Sarbu C., Casoni D., Darabant M., Maiereanu C., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 35, 213–219.
- [39] Bro R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1997, 38, 149–171.
- [40] Komsta Ł., Skibiński R., Berecka A., Gumieniczek A., Radkiewicz B., Radoń M., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2010, 53, 911–918.
- [41] Smilde A., Bro R., *Multi-way analysis with applications in the chemical sciences*, John Wiley & Sons, New York, USA, 2005.
- [42] Andersen C.M., Bro R., *J. Chemometr.*, 2003, 17, 200–215.
- [43] Bro R., Viereck N., Toft M., Toft H., Hansen P.I., Engelsen S.B., *Trends Anal. Chem.* 2010, 29, 281–284.
- [44] Kriegel H.P., Kroger P., Zimek A., *ACM Transact. Knowl. Discov. Data*, 2009, 3, 1–15.
- [45] Draisma H.H.M., Reijmers T.H., Meulman J.J., van der Greef J., Hankemeier T., Boomsma D.I., *Eur. J. Human Genet.*, 2013, 21, 95–101.
- [46] Capone S., Epifani M., Quaranta F., Siciliano P., Taurino A., Vasanelli L., *Sensor Actuat. B-Chem.*, 2001, 78, 174–179.
- [47] Mehl P.M., Chao K., Kim M., Chen Y.R., *Appl. Eng. Agric.*, 2002, 18, 219–226.
- [48] Bro R., Smilde A.K., *Anal. Methods*, 2014, 6, 2812–2831.
- [49] Daszykowski M., *J. Chemom.*, 2007, 21, 270–279.
- [50] Ebrahimi D., Kennedy D.F., Messerle B.A., Hibbert D.B., *Analyst*, 2008, 133, 817–822.
- [51] Van Benthem M.H., Lane T.W., Davis R.W., Lane R.D., Keenan M.R., *Chemometr. Intell. Lab.*, 2011, 106, 115–124.
- [52] Amigo J.M., Skov T., Coello J., MasPOCH S., Bro R., *Trends Anal. Chem.*, 2008, 27, 714–725.

- [53] Mannhold R., van de Waterbeemd H., *J. Comput. Aid. Mol. Desi.*, 2001, 15, 337–354.
- [54] DrugBank www.drugbank.ca
- [55] Farthing C., Farthing D., Brophy D.F., Larus T., Maynor L., Fakhry I., Gehr T.W.B., *Chromatographia*, 2008, 67, 365–368.
- [56] Nemutlu E., Kir S., Katlan D., Sinan Beksac M., *Talanta*, 2009, 80, 117–126.
- [57] Ocana Gonzalez J.A., Callejon Mochon M., Barragan de la Rosa F.J., *Microchim. Acta*, 2005, 151, 39–45.
- [58] Subramanian N.H., Thyagarajan S., Manigandan P., Jeevan R.G., Radhakrishnan G., *J. Pharm. Sci.*, 2009, 47, 549–552.
- [59] Kumar V.J., Gupta P.B., Pavan Kumar K.S.R., Prasada Rao K.V.V., Rao K.R., Prasanna S.J., Kumar Sharma H., Mukkanti K., *Anal. Sci.*, 2010, 26, 1081–1086.
- [60] Gowri Sankar D., Durvasa Rao B., Madhavi Latha P.V., Vamsi Krishna M. Spectrophotometric determination of ezetimibe and cefepime. *Asian J. Chem.*, 2007, 19, 1613–1615.
- [61] Liu H., Suderland V.B., *J. Liq. Chromatogr. Rel. Tech.*, 2005, 27, 3065–3076.
- [62] Palacios F.J.J., Mochon M.C., Sanchez J.C.J., Carranza J.H., *J. Pharm. Sci.*, 2003, 92, 1854–1859.
- [63] ICH. Harmonized Tripartite Guideline Q2(R1) on “Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology”, International Conference on Harmonization: Geneva, 2005.
- [64] Zaheer M.R., Gupta A., Iqbal J., Zia Q., Ahmad A., Roohi O.M. Hashlamon A., Setapar S.H.M., Ashraf G.M., Aliev G., *Curr. Pharm. Des.*, 22, 2016, 768–782.
- [65] Trawiński J., Skibiński R., *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, 24, 1152–1199.
- [66] Tønnesen H., *Int. J. Pharm.*, 2001, 225, 1–14.
- [67] Krzek J., Sherma J., *J. AOAC Int.*, 2010, 93, 1086–1092.
- [68] Krzek J., Dąbrowska –Tylka M., *Chromatographia*, 2003, 58, 231–234.
- [69] Kohanski M.A., Dwyer D.J., Wierzbowski J., Cottarel G., Collins J.J., *Cell*, 2008, 135, 679–690.
- [70] Kohanski M.A., De Pristo M.A., Collins J.J., *Mol. Cell*, 2010, 37, 311–320.
- [71] Dwyer D.J., Kohanski M.A., Collins J.J., *Curr. Opin. Microbiol.*, 2009, 12, 482–489.
- [72] Liu Y., Imlay J.A., *Science*, 2013, 339, 1210–1213.
- [73] Keren I., Wu Y., Inocencio J., Mulcahy L.R., Lewis K., *Science*, 2013, 339, 1213–1216.
- [74] Brynildsen M.P., Winkler J.A., Spina C.S., Mac Donald I.C., Collins J.J., *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31, 160–165.
- [75] Dąbrowska M., Starek M., Pikulska S., *J. Planar Chromatogr.*, 2011, 24, 23–29.
- [76] Dąbrowska M., Krzek J., Miękina E., *J. Planar Chromatogr.*, 2012, 25, 127–134.
- [77] Can N.O., Altiokka G., Aboul-Enein H.Y., *Anal. Chim. Acta*, 2006, 576, 246–252.
- [78] Isla A., Arzuaga A., Maynar J., Gascon A.R., Solinis M.A., Corral E., Pedraz J.L., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, 39, 996–1005.
- [79] Vera Lopez K.J., Faria Bertoluci D., Vicente K.M., Dell’ Aquilla A.M., Jorge Santos S.R.C., *J. Chromatogr. B*, 2007, 860, 241–245.
- [80] Jimenez Palacios F.J., Callejon Mochon M., Jimenez Sanchez J.C., Bello Lopez M.A., Guiraum Perez A., *Chromatographia*, 2005, 62, 355–361.

- [81] Partani P., Gurule S., Khuroo A., Monif T., Bhardwaj S., *J. Chromatogr. B*, 2010, 878, 428–434.
- [82] Viberg A., Sandstrom M., Jansson B., *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2004, 18, 707–710.
- [83] Zhao L., Zhao Y., Li Q., Chen X., Xiao F., He B., Wang J, Bi K., *Talanta*, 2012, 89, 84–90.

4. POZOSTAŁE OSIĄGNIĘCIA NAUKOWO-BADAWCZE

Sumaryczny *Impact Factor* dla całego dorobku naukowego: **34.135**

Łączna suma punktów MNiSW dla całego dorobku naukowego: **498**

Łączna liczba cytowań: 95 (*Web of Science Core Collection – „Cited Reference Search” 1945-2017 z dn. 09.10.2017 z dnia 19.09.2017 r.*)

Współczynnik Hirscha: 6 (*Web of Science Core Collection – „Cited Reference Search” 1945-2017 z dn. 09.10.2017 z dnia 19.09.2017 r.*)

4.1. Działalność naukowo-badawcza przed uzyskaniem stopnia doktora

Moje zainteresowanie nauką, w szczególności tematyką biologiczno–chemiczną zaczęło się już w czasach licealnych (1986-1990; Liceum Ogólnokształcące im. Stefana Czarneckiego w Koźmicach, klasa o profilu biologiczno-chemicznym). Poszukiwanie głębszej wiedzy w tym zakresie skłoniło mnie do uczestnictwa w warsztatach i kursach naukowych prowadzonych przez Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Konsekwencją tych zainteresowań było podjęcie studiów na Oddziale Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum w Krakowie. W 1998 roku, na podstawie pracy magisterskiej pt. „Zagęszczanie i sporządzanie liniowych gradientów stężeń składników płynów biologicznych metodą zamrażania/rozmarzania” uzyskałam dyplom i tytuł magistra analityki medycznej. Pracę wykonałam w Zakładzie Immunochemii Klinicznej II Katedry Chorób Wewnętrznych UJ CM, pod kierunkiem Pana doc. dr hab. Władysława Pajdaka.

Po studiach zostałam zatrudniona na etacie asystenta w Zakładzie Chemii Nieorganicznej Katedry Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM, gdzie rozpoczęłam pracę w zespole kierowanym przez Pana prof. dr hab. Jana Krzeka, ówczesnego Kierownika Zakładu Chemii Nieorganicznej ww. Katedry oraz Laboratorium Kontroli Jakości Leków w Krakowie. Początkowo moje prace badawcze związane były z różnymi zagadnieniami chemii analitycznej, zwłaszcza możliwościami wykorzystania metody chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną w analizie farmaceutycznej. Początkowe badania dotyczyły oznaczania jakościowego i ilościowego glikliazydu, budezonidu, genistyny i daidzyny w czystej postaci jak i w formie leku.

Wyniki powyższych prac zostały opublikowane w czasopismach: JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC i Chromatographia.

Zagadnienia dotyczące stabilności cefalosporyn, ze szczególnym uwzględnieniem trwałości ich połączeń kompleksowych z cyklodekstrynami, stanowiły zasadniczy kierunek moich dalszych badań, ujętych w rozprawie doktorskiej. Opracowałam metodę chromatograficzno–densytometryczną przydatną do identyfikacji i oznaczania ilościowego ośmiu cefalosporyn (cefotaksymu, cefuroksymu, estru acetoksyetylowego cefuroksymu, cefadroksylu, cefaleksyny cefakloru i ceftriaksonu) oraz ustaliłam warunki chromatograficznego rozdzielania izomerów estru acetoksyetylowego cefuroksymu, cefakloru i ceftriaksonu z zastosowaniem β -cyklodekstryny jako chiralnego modyfikatora. Ponadto, wykorzystując opracowaną i zwalidowaną (zgodnie z wymogami ICH) metodę, sprawdziłam stabilność badanych cefalosporyn w czasie, w zmiennych warunkach pH, bez oraz w obecności β -cyklodekstryny. Odzwierciedleniem przeprowadzonych analiz była seria publikacji (4 publikacje w czasopismach znajdujących się na liście filadelfijskiej) oraz 5 komunikatów zjazdowych.

Na podstawie rozprawy doktorskiej pt. "Analiza wybranych cefalosporyn z udziałem β -cyklodekstryny w aspekcie rozdzielania izomerów i oceny trwałości" wykonanej pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Jana Krzeka, w 2008 roku uchwałą Rady Wydziału Farmaceutycznego UJ CM w Krakowie, został mi nadany dyplom i stopień naukowy doktora nauk farmaceutycznych w specjalności chemia analityczna.

Wykaz publikacji oryginalnych przed uzyskaniem stopnia doktora:

1. Krzek J., Dąbrowska M., Hubicka U., Identification and determination of gliclazide and its impurities in various medicines by Thin-Layer Chromatography and densitometry, JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2001,14, 183–187

IF₂₀₀₁ = 0.555 MNiSW₂₀₀₁ = 8 pkt

2. Krzek J., Hubicka U., Dąbrowska-Tylka M., Leciejewicz-Ziemecka E., Determination of budesonide R(+) and S(-) isomers in pharmaceutical by Thin-Layer Chromatography with UV densitometric detection, Chromatographia, 2002, 56,759–762

IF₂₀₀₂ = 1.230 MNiSW₂₀₀₂ = 9 pkt

3. Krzek J., Dąbrowska-Tylka M., Simultaneous determination of cefuroxime axetil and cefuroxime in pharmaceutical preparations by Thin-Layer Chromatography and densitometry, Chromatographia, 2003, 58, 231–234

IF₂₀₀₃ = 1.145 MNiSW₂₀₀₃ = 9 pkt

4. Janeczko Z., Krzek J., Pisulewska E., Sobolewska D., Dąbrowska-Tylka M., Hubicka U., Podolak I., Densitometric determination of genistin and daidzin in different cultivars of soy (*Glycine max*), JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 2004,17, 32–35

IF₂₀₀₄ = 0.824 MNiSW₂₀₀₄ = 8 pkt

4.2. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk farmaceutycznych, moja aktywność naukowa związana była z optymalizacją układów chromatograficznych do analizy związków wykazujących działanie biologiczne, zarówno w postaci czystej jak i formie preparatów farmaceutycznych, ze szczególnym uwzględnieniem antybiotyków cefalosporynowych. Ustaliłam warunki analiz oraz przeprowadziłam badania stabilności antybiotyków i niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w zmiennych warunkach środowiska, uwzględniając wpływ czynników redoks oraz jonów metali. Analizowałam również wpływ promieniowania UV na szybkość procesu rozkładu cefalosporyn oraz zaproponowałam możliwe drogi degradacji analizowanych związków. Ponadto opracowałam i zwalidowałam, zgodnie z wytycznymi ICH, metody oznaczania cefalosporyn w złożonej matrycy jaką stanowi materiał biologiczny, które ze względu na specyficzność, szybkość i prostotę wykonania mogą być z powodzeniem stosowane w rutynowej analizie laboratoryjnej.

Biorąc pod uwagę znaczenie lipofilowości w przewidywaniu aktywności biologicznej, wykorzystując metodę chromatografii cienkowarstwowej i wyznaczone parametry retencji opisujące lipofilowość związków ($R_{M0} \equiv \log P$), sprawdziłam możliwość oceny cefalosporyn w ujęciu ich aktywności przeciwbakteryjnej i budowy chemicznej. W celu oceny rzetelności otrzymywanych wyników otrzymane dane porównałam z wartościami uzyskanymi innymi eksperymentalnymi metodami: HPLC z wykorzystaniem kolumny IAM, 'shake-flask', a także z danymi obliczonymi przy użyciu różnych algorytmów matematycznych.

Mój warsztat badawczy uległ znacznemu poszerzeniu, głównie za sprawą nawiązania współpracy z Katedrą i Zakładem Chemii Leków Uniwersytetu Medycznego w Lublinie, co zaowocowało wspólnymi publikacjami. Do analizy danych uzyskanych z przeprowadzonych przeze mnie oznaczeń wykorzystywałam techniki chemometryczne takie jak HCA, PCA i PARAFAC, które umożliwiły mi sformułowanie wysoce prawdopodobnych wniosków, zdefiniowanie odpowiednich zależności, różnic i podobieństw, wynikających z przeprowadzonych badań.

Ponadto, w związku z pojawiającą się na rynku dużą ilością suplementów diety oraz zafałszowanych produktów farmaceutycznych lub o rzeczywistym składzie niezgodnym z deklaracjami producenta, moje zainteresowania skierowały się ku poszukiwaniu doskonalszych metod analizy tego typu produktów. Badaniami objęłam preparaty zawierające w swoim składzie m.in. L-karnitynę, β -karoten, witaminę K, luteinę, lecytynę i kwasy omega-3. W opracowywaniu procedur ich jakościowej i ilościowej analizy wykorzystuję metody TLC z detekcją densytometryczną, HPLC-MS/MS i GC-FID. Natomiast do analizy pierwiastków obecnych w wielu z tych produktów stosuję metodę atomowej spektrometrii absorpcyjnej (AAS). Ten kierunek mojej działalności naukowej wpisał się w tematykę podejmowaną przez Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne. W roku 2015 grupa inicjatywna, której byłam członkiem, utworzyła Ogólnopolską Sekcję Naukową ds. Sfałszowanych Leków.

W ramach prowadzonej aktywności naukowej realizowałam projekty z dotacji na podtrzymanie potencjału badawczego, w których byłam kierownikiem (**Załącznik 3, II-H**).

Przez cały okres zatrudnienia doskonaliłam umiejętności w zakresie wykorzystania technik analitycznych uczestnicząc w szkoleniach, kursach i seminariach (**Załącznik 3, III-Q**). Ponadto swoją wiedzę i warsztat badawczy poszerzałam biorąc udział w studiach podyplomowych w zakresie Prawa Dowodowego oraz Biologii Molekularnej prowadzonych odpowiednio przez Wydział Prawa i Administracji Uniwersytetu Jagiellońskiego i Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Uzyskana wiedza i umiejętności pozwoliły mi na podjęcie współpracy z Wydziałem Lekarskim i Wydziałem Nauk o Zdrowiu Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum oraz Instytutem Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego w Balicach. Zaowocowała ona realizacją grantu rozwojowego pt. "Uzyskanie transgenicznych świń jako dawców tkanek i narządów do transplantacji u ludzi oraz ich biotechnologiczna, fizjologiczna i medyczna charakterystyka", w którym pełniłam rolę wykonawcy (Nr N R12 03606/13/2009 DOP-D/141/09). Wyniki badań naszego zespołu zostały zaprezentowane w postaci posterów na konferencjach międzynarodowych i krajowych (**Załącznik 3, III-B**), rozdziałów w książkach (**Załącznik 3, II-D**) oraz artykułów w czasopismach naukowych (**Załącznik 3, II-A**). Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora opracowałam i uzupełniłam wyniki badań zawartych w rozprawie doktorskiej. Od tego czasu opublikowałam 22 prace oryginalnych z IF, 2 prace popularnonaukową, 3 prace przeglądowych oraz 3 rozdziały w książkach. Wyniki moich dotychczasowych badań zaprezentowałam w formie 48 wystąpień na konferencjach, zjazdach i seminariach zarówno międzynarodowych jak i krajowych. Recenzowałam prace naukowe dla czasopism międzynarodowych, posiadających wskaźnik IF (**Załącznik 3, III-P**). Ponadto jestem członkiem rad naukowych czasopism (**Załącznik 3, III-G**). Za osiągnięcia naukowe za 2011, 2012 i 2014 rok zostałam uhonorowana nagrodami przez Dziekana Wydziału Farmaceutycznego UJ CM.

Wykaz publikacji oryginalnych, po uzyskaniu stopnia doktora (innych niż stanowiące podstawę habilitacji):

1. Dąbrowska M., Krzek J., Chiral separation of diastereoisomers of cefuroxime axetil by High-Performance Thin-Layer Chromatography, 2010, Journal of AOAC International, 93, 771-777

IF₂₀₁₀ = 1.229 MNiSW₂₀₁₀ = 27 pkt

2. Dąbrowska M., Krzek J., 2010, Separation, identification, and quantitative analysis of the epimers of cefaclor by TLC-densitometry, JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC, 23, 256-269

IF₂₀₁₀ = 1.247 MNiSW₂₀₁₀ = 20 pkt

3. Dąbrowska M., Starek M., Pikulska S., Simultaneous identification and quantitative determination of eight cephalosporins in pharmaceutical formulations by TLC-densitometry, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2011, 24, 23–29

IF₂₀₁₁ = 0.767 **MNiSW₂₀₁₁ = 20 pkt**

4. Starek M., Dąbrowska M., Tarsa M., Analysis of nefopam by TLC-densitometry. A study of degradation mechanism in solutions under stress conditions, *Acta Chimica Slovenica*, 2011, 58, 262–269

IF₂₀₁₁ = 1.328 **MNiSW₂₀₁₁ = 25 pkt**

5. Starek M., Łaskawski Sz., Dąbrowska M., Identification and quantitative determination of nabumetone in pharmaceutical preparations by TLC-densitometry, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2011, 24, 513–519

IF₂₀₁₁ = 0.767 **MNiSW₂₀₁₁ = 20 pkt**

6. Starek M., Dąbrowska M., Development and validation of a TLC-densitometry method for quantitative analysis of nefopam hydrochloride beside its degradation products, *Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 67, 733–739

IF₂₀₁₂ = 0.616 **MNiSW₂₀₁₂ = 15 pkt**

7. Starek M., Dąbrowska M., Chromatographic techniques in analysis of COX-2 inhibitors in drugs and biological samples, *Central European Journal of Chemistry*, 2012, 10, 711–730

IF₂₀₁₂ = 1.167 **MNiSW₂₀₁₂ = 25 pkt**

8. Dąbrowska M., Krzek J., Miękina E., Stability analysis of cefaclor and its inclusion complexes of β -cyclodextrin by thin-layer chromatography and densitometry, *JPC – Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2102, 25, 127-132

IF₂₀₁₂ = 0.955 **MNiSW₂₀₁₂ = 20 pkt**

9. Dąbrowska M., Siczka E., Starek M., TLC assay of L-carnitine in dietary supplements, *JPC – Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2012, 5, 450–455

IF₂₀₁₂ = 0.955 **MNiSW₂₀₁₂ = 20 pkt**

10. Dąbrowska M., Starek M., Analytical approaches to determination of carnitine in biological material, foods and dietary supplements, *Food Chemistry*, 2014, 142, 220–232

IF₂₀₁₄ = 3.391 **MNiSW₂₀₁₄ = 40 pkt**

11. 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, *Analytical Methods*, 2014, 6, 9093–9100

IF₂₀₁₄ = 1.821 **MNiSW₂₀₁₄ = 25 pkt**

12. Starek M., Guja A., Dąbrowska M., Krzek J., Assay of β -carotene in dietary supplements and fruit juices by TLC-densitometry, *Food Analytical Methods*, 2015, 8, 1347–1355

IF₂₀₁₅ = 2.167 MNiSW₂₀₁₅ = 30 pkt

13. Starek M., Dąbrowska M., Bracha M., Opoka W., Experimental study of the stability of some oxicams in contact with various redox agents, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 2016, 29, 273–280

IF₂₀₁₆ = 0.736 MNiSW₂₀₁₆ = 15 pkt

Aktualnie kontynuuję badania dotyczące właściwości fizykochemicznych cefalosporyn; kompleksowania z cyklodekstrynami, badania potencjalnych interakcji antybiotyku z innymi grupami leków. Ponadto podjęłam badania związane z możliwościami usuwania zanieczyszczeń środowiskowych antybiotykami na drodze remediacji. Równoległe do powyższych badań, realizuję tematykę związaną z szeroko pojętą jakością suplementów diety i związanego z tym bezpieczeństwa ich stosowania. Uzyskane wyniki badań będą przedmiotem kolejnych artykułów, przygotowywanych do publikacji w czasopismach naukowych.

5. DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I ORGANIZACYJNA

Od chwili zatrudnienia w Katedrze Chemii Nieorganicznej i Analitycznej Wydziału Farmaceutycznego UJ CM prowadzę zajęcia dydaktyczne ze studentami Wydziału Farmaceutycznego i Oddziału Analityki Medycznej. Obejmują one zajęcia laboratoryjne ze studentami pierwszego i drugiego roku z zakresu chemii ogólnej, nieorganicznej i analitycznej, w ramach których prowadzona jest analiza jakościowa roztworów soli i ich mieszanin, badania tożsamości jonów, czystości związków zgodnie z wytycznymi farmakopealnymi oraz analiza ilościowa substancji. W ramach zajęć opracowałam i przygotowuję ćwiczenia dotyczące „Wytrącania wybranych osadów i ich obserwacji przy użyciu mikroskopu”, „Oznaczanie jonów chlorkowych metodą Fajansa”, ćwiczenia mające na celu przybliżenie studentom metod optycznych („Spektrofluorymetryczne oznaczanie fluoresceiny”) oraz rozdzielczych takie jak chromatografia cienkowarstwowa („Określenie tożsamości wybranych alkaloidów metodą TLC”), chromatografia gazowa („Oznaczanie jakościowe i ilościowe dwóch składników obok siebie metodą GC”) czy elektroforeza („Elektroforetyczne oznaczanie DNA”). Ponadto ze studentami Oddziału Analityki Medycznej prowadzę zajęcia dotyczące technik ekstrakcji składników o działaniu biologicznym z surowicy krwi i preparatów farmaceutycznych wraz z oceną ich wydajności. Jestem zaangażowana w prowadzenie seminariów obliczeniowych obejmujących zakres chemii ogólnej (pierwszy rok farmacji) i analizy miareczkowej (pierwszy rok analityki medycznej). Ponadto dla obu kierunków opracowałam i prowadzę seminaria z zakresu analizy instrumentalnej na temat chromatografii cienkowarstwowej i gazowej oraz wykorzystania chromatografii cieczowej do analizy związków o charakterze jonowym. Uczestniczyłam w opracowywaniu konspektów do ćwiczeń praktycznych oraz

seminariów z obliczeń chemicznych dotyczących przeliczania stężeń, roztworów buforowych, rozpuszczalności, wyznaczania stałych charakteryzujących związki kompleksowe czy reakcji utleniania i redukcji.

Poza zajęciami laboratoryjnymi byłam opiekunem 3 i promotorem 9 prac magisterskich prowadzonych na kierunku Farmacja. W ramach prowadzonych prac realizowałam tematykę z obszaru moich badań. Staralam się, aby każda z wykonywanych prac wykazywała walor naukowy i stanowiła podstawę do opracowania w postaci artykułów naukowych. Byłam także recenzentem prac magisterskich realizowanych na Wydziale Farmaceutycznym.

Równoległe do mojej aktywności naukowej i dydaktycznej staram się ciągle podnosić swoje kwalifikacje i umiejętności. Uczestniczyłam w kursach i szkoleniach mających na celu unowocześnienie formy i sposobu przekazywania wiedzy (warsztaty „Ars Docendi” zorganizowane przez UJ, szkolenie „Sztuka prezentacji” zorganizowane przez CITTRU), jak również doskonalących zawodowo, poszerzających wiedzę na temat nowoczesnych rozwiązań i technologii w farmacji i medycynie (Kurs Podstawowy Nowoczesnej Chromatografii Cieczowej; Seminarium “Nowoczesne rozwiązania w analizie instrumentalnej”; Seminarium Naukowe „Optymalizacja warunków analizy w pracy z HPLC i UHPLC oraz spektrometrami mas”; Seminarium Naukowe „Technika GC-MS/MS – luksus czy konieczność?”; kurs doskonalący „Alkohologia sądowa i narkomania”; „Warsztaty z wykorzystania metod chemometrycznych w praktyce” (**Załącznik 3, III-Q**).

W ramach działalności popularyzatorskiej brałam czynny udział w organizacji ekspozycji i prezentacji Wydziału Farmaceutycznego na Festiwalach Nauki, które odbyły się w latach 2004-2008 oraz 2013-2017 oraz Targach Edukacyjnych w Krakowie (**Załącznik 3, III-I**). Brałam udział w tworzeniu stron edukacyjnych dotyczących prozdrowotnego działania kwasów omega 3 oraz pieczarki brazylijskiej (**Załącznik 3, III-A**).

W ramach działalności organizacyjnej brałam udział w pracach Komisji Rekrutacyjnej w latach 2004-2008, a także w realizacji obchodów 650-lecia Uniwersytetu Jagiellońskiego (w ramach działalności Biura Jubileuszowego). Byłam członkiem komitetu organizacyjnego Sympozjum „Problemy analityczne w ocenie czystości i farmakokinetyki leku” organizowanego przez Wydział Farmaceutyczny CM UJ, 8-go Międzynarodowego Kongresu Raka Żołądka (8th International Gastric Cancer Congress) organizowanego przez International Gastric Cancer Association, a także XXIII Naukowego Zjazdu Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego organizowanego przez PTFarm (**Załącznik 3, III-C**).

Ponadto brałam udział w szkoleniach dotyczących możliwości modernizacji i polepszania organizacji pracy w laboratorium (Seminarium „Polskie laboratoria w Europie XXI wieku”, organizowany przez Laboratoryjny Serwis Informacyjny oraz Pełnomocnika Rektora UJ ds. Osób Niepełnosprawnych w Krakowie; Konferencja „Perspektywy rozwoju laboratoriów badawczych – technologie, jakość, finansowanie” organizowana przez Laboratorium Przegląd Ogólnopolski we Wrocławiu) (**Załącznik 3, III-Q**).

W związku z ukończeniem kursu Europejskiej Rady Resuscytacji BLS/AED od 2010 roku pełnię w Katedrze funkcję osoby odpowiedzialnej za udzielanie pierwszej pomocy oraz za zapewnienie środków do jej udzielania. Ukończyłam również szkolenie z zakresu obsługi butli ciśnieniowych do gazów stosowanych w laboratoriach badawczych zorganizowane przez Inspektorat BHP UJ (**Załącznik 3, III-Q**).

Jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego, Polskiego Towarzystwa Magnezologicznego oraz Krajowej Izby Diagnostów Laboratoryjnych, a także członkiem Ogólnopolskiej Sekcji Naukowej ds. Sfałszowanych Leków Polskiego Towarzystwa Farmaceutycznego (**Załącznik 3, III-H**).

Monika Dąbrowska