

**WYBRANE METODY SEPARACYJNE  
I WOLTAMPEROMETRYCZNE W ANALIZIE  
LEKÓW I SUBSTANCJI ENDOGENNYCH DLA  
DIAGNOSTYKI I TERAPII KLINICZNEJ**

SELECTED SEPARATION AND VOLTAMMETRIC  
METHODS IN THE ANALYSIS OF DRUGS  
AND ENDOGENOUS SUBSTANCES FOR  
DIAGNOSTICS AND CLINICAL THERAPY

**Irena Baranowska\*, Sylwia Bajkacz,  
Piotr Markowski, Joanna Płonka**

*Politechnika Śląska, Wydział Chemiczny,  
Katedra Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii,  
ul. Krzywoustego 6,  
44-100 Gliwice*

*\*e-mail: irena.baranowska@polsl.pl*

---

Abstract

Wykaz stosowanych symboli i oznaczeń

Wprowadzenie

1. Techniki ekstrakcyjne w badaniach nad przygotowaniem próbek biologicznych do analizy
2. Zastosowanie technik separacyjnych i spektralnych w badaniach nad oznaczaniem leków i związków pochodzenia endogenego
3. Techniki woltamperometryczne w analizie materiału klinicznego
4. Zastosowanie opracowanych metod do oznaczania wybranych leków, ich metabolitów i substancji endogennych w płynach ustrojowych

Uwagi końcowe

Piśmiennictwo cytowane

---



**Prof. dr hab. Irena Staneczko-Baranowska** – była przez 20 lat kierownikiem Katedry Chemii Analitycznej Politechniki Śląskiej w Gliwicach. Opublikowała ponad 200 artykułów, jest edytorem 4 monografii (Springer, PWN, Malamut) i współautorem 13 książek (PZWL, WNT, Pol. Śl.). Była koordynatorem oficjalnej międzynarodowej współpracy naukowej – 10-letniej z King's College Univ. of London i 5-letniej z Instituto de Investigaciones Biomedicas de Barcelona. Była koordynatorem trzech projektów z Francją, Hiszpanią i Niemcami. Jest członkiem Prezydium Komitetu Chemii Analitycznej PAN, wcześniej 3 kadencje była przewodniczącą KChA PAN. Była członkiem Sekcji T09 w KBN, a następnie w Ministerstwie Nauki i Informatyzacji i członkiem Zespołu Ekspertów w NCN. Była kierownikiem pięcioletniego grantu z UE, TESSA-PHARE, 5 grantów zwykłych i 3 promotorskich z KBN i NCN oraz kierownikiem w 3 zadaniach w grantach INNOTECH i BIOSTRATEG 2. Odznaczona medalami im. W. Kemuli i im. A. Waksmundzkiego za wybitne osiągnięcia z chemii analitycznej i metod separacyjnych. Przez dwie kadencje była Przewodniczącą Gliwickiego Oddziału PTChem. Wypromowała 19 doktorów, a dwoje jej wychowanków zostało doktorami habilitowanymi. Była recenzentem licznych doktoratów, habilitacji i wniosków o tytuł profesora.



<https://orcid.org/0000-0003-1093-5099>



**Dr hab. inż. Sylwia Bajkacz** – w 2008 r. otrzymała tytuł magistra inżyniera na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej, w 2012 r. stopień doktora chemii w tej samej jednostce, a w 2016 r. stopień doktora habilitowanego. Zainteresowania badawcze: metody rozdzielania i spektralne dla potrzeb diagnostyki medycznej oraz do monitorowania wybranych mikrozanieczyszczeń antropogenicznych i produktów ich transformacji w środowisku. Jest autorem 59 prac z listy JCR. Była kierownikiem trzech projektów badawczych przyznanych przez NCN oraz MNiSzW. Otrzymała stypendium Ministra Szkolnictwa Wyższego dla wybitnych młodych naukowców, nagrodę za najlepszą pracę doktorską w dziedzinie chemii analitycznej związaną z rozwojem technik rozdzielania przyznaną przez Komitet Chemii Analitycznej PAN, Nagrodę Polskiego Towarzystwa Chemicznego za Osiągnięcie Naukowe oraz inne.



<https://orcid.org/0000-0002-9021-5376>



**Dr inż. Piotr Markowski** ukończył studia magisterskie na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach w roku 2004 r., w tej samej jednostce otrzymał stopień doktora nauk chemicznych w 2010 r. Jest adiunktem w Katedrze Chemii Nieorganicznej, Analitycznej i Elektrochemii tej uczelni. Specjalność – chemia analityczna, elektrochemia.



<https://orcid.org/0000-0001-6675-5658>



**Dr inż. Joanna Płonka** (ur. w 1980 r. w Zabrze) otrzymała tytuł magistra inżyniera na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach w roku 2004. Karierę naukową rozpoczęła w Katedrze Chemii Analitycznej Politechniki Śląskiej w Gliwicach, gdzie w roku 2009 obroniła z wyróżnieniem pracę doktorską. Zakres jej zainteresowań obejmuje analizę związków biologicznie czynnych w płynach ustrojowych i żywności z wykorzystaniem technik chromatograficznych z różnymi detektorami (UV/VIS, DAD, FL, EC, MS) oraz analizę wielopierwiastkową z wykorzystaniem spektrometrii fluorescencji rentgenowskiej.



<https://orcid.org/0000-0002-2507-2508>

---

**ABSTRACT**

The developed chromatographic methods (HPLC and UHPLC/UV, DAD, FL, ED, MS-MS and GC-MS), for the determination of drugs from different therapeutic groups in body fluids, have been presented. Drugs were determined alongside their metabolites, in different concentration ranges, usually after a removal of the interferences from the biological material matrix. Extraction procedures, like LLE, SPE, MEPS, SALLE, USAEME, have been developed for the separation of analytes.

Methods for the determination of endogenous compounds: L-carnitine, L-arginine and their metabolites, dopamine and its metabolites, and other compounds resulting from their metabolism have also been developed.

Cyclic voltammetry and differential pulse voltammetry methods for the determination of electrochemically active drugs have also been presented. Such methods can be used to verify the results of chromatographic determinations.

This article presents the results of the research included in 35 publications from the JCR list.

Keywords: chromatography, voltammetry, drugs, biogenic amines, extraction, spectrometry

Słowa kluczowe: chromatografia, woltamperometria, leki, aminy biogenne, ekstrakcja, spektrometria

---

---

## WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1,3DMU	– (ang. <i>1,3-dimethyluric acid</i> ) kwas 1,3-dimetylomoczowy
1MX	– (ang. <i>1-methylxanthine</i> ) 1-metyloksantyna
3MT	– (ang. <i>3-methoxytyramine</i> ) 3-metoksytyramina
3MX	– (ang. <i>3-methylxanthine</i> ) 3-metyloksantyna
5HIAA	– (ang. <i>5-hydroxyindoleacetic acid</i> ) kwas 5-hydroksyindoloctowy
5HT	– (ang. <i>5-hydroxytryptamine</i> ) serotonina
B1, B2, B3, B6, B12, C	– witaminy
CA	– (ang. <i>cluster analysis</i> ) analiza skupień
CAFF	– (ang. <i>caffeine</i> ) kofeina
CE	– (ang. <i>capillary electrophoresis</i> ) elektroforeza kapilarna
CV	– (ang. <i>cyclic voltammetry</i> ) woltamperometria cykliczna
DA	– (ang. <i>dopamine</i> ) dopamina
DAD	– (ang. <i>diode-array detector</i> ) detektor spektrofotometryczny z matrycą diodową
DE	– (ang. <i>derivatization</i> ) derywatyżacja
DHPG	– (ang. <i>3,4-dihydroxyphenylglycol</i> ) glikol 3,4-dihydroksyfenyloetylenowy
DOMA	– (ang. <i>3,4-dihydroxymandelic acid</i> ) kwas 3,4-dihydroksymigdałowy
DOPAC	– (ang. <i>3,4-dihydroxyphenylacetic acid</i> ) kwas 3,4-hydroksyfenyloctowy
DPV	– (ang. <i>differential pulse voltammetry</i> ) woltamperometria pulsowa-różnicowa
E	– (ang. <i>epinephrine</i> ) epinefryna
ED	– (ang. <i>electrochemical detector</i> ) detektor elektrochemiczny
FL	– (ang. <i>fluorescence detector</i> ) detektor fluorescencyjny
GC	– (ang. <i>gas chromatography</i> ) chromatografia gazowa
GCE	– (ang. <i>glassy carbon electrode</i> ) elektroda z węgla szklistego
HE	– (ang. <i>enzymatic hydrolysis</i> ) hydroliza enzymatyczna
HILIC	– (ang. <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> ) chromatografia oddziaływań hydrofilowych
HMDE	– (ang. <i>hanging mercury drop electrode</i> ) wisząca kroplowa elektroda rtęciowa
HVA	– (ang. <i>homovanillic acid</i> ) kwas homowanilinowy
HPLC	– (ang. <i>high performance/pressure liquid chromatography</i> ) wysokosprawna chromatografia cieczowa
LC	– (ang. <i>liquid chromatography</i> ) chromatografia cieczowa

---

LLE	– (ang. <i>liquid-liquid extraction</i> ) ekstrakcja ciecz-ciecz
MEPS	– (ang. <i>microextraction by packed sorbent</i> ) mikroekstrakcja do upakowanego sorbentu
MHPG	– (ang. <i>3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol</i> ) glikol 3-metoksy-4-hydroksyfenylo-etylenowy
MN	– (ang. <i>methanephine</i> ) metanefryna
MRM	– (ang. <i>multiple reaction monitoring</i> ) monitorowanie wybranych reakcji fragmentacji
MS/MS	– (ang. <i>tandem mass spectrometry</i> ) tandemowy spektrometr mas
MSTFA	– (ang. <i>N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide</i> ) N-metylo-N-(trimetylosililo) trifluoroacetamid
MWCNTs	– (ang. <i>multi-walled carbon nanotubes</i> ) wielościenne nanorurki węglowe
NE	– (ang. <i>norepinephrine</i> ) norepinefryna
NMN	– (ang. <i>normetanephine</i> ) normetanefryna
PCA	– (ang. <i>principal component analysis</i> ) analiza czynników głównych
PP	– (ang. <i>protein precipitation</i> ) strącanie białek
SALLE	– (ang. <i>salting-out assisted liquid-liquid extraction</i> ) ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz wspomagana wysalaniem
SPE	– (ang. <i>solid phase extraction</i> ) ekstrakcja do fazy stałej
SRM	– (ang. <i>selected reaction monitoring</i> ) monitorowanie wybranych reakcji
THPH	– (ang. <i>theophylline</i> ) teofilina
UHPLC	– (ang. <i>ultra high performance/pressure liquid chromatography</i> ) ultrasprawa chromatografia cieczowa
USAEME	– (ang. <i>ultrasound-assisted emulsification-microextraction</i> ) mikroekstrakcja kroplą rozpuszczalnika przez emulgację wspomaganą ultradźwiękami
VMA	– (ang. <i>vanillylmandelic acid</i> ) kwas wanilino migdałowy
UV	– (ang. <i>ultraviolet</i> ) detektor spektrofotometryczny

## WPROWADZENIE

Od dawna rosną wymagania odnośnie jakości i rodzaju badań analitycznych w ważnych dziedzinach nauki, związanych ze zdrowiem ludzi. Można zauważyć poszukiwania wpływów różnych czynników, w tym stanu środowiska przyrodniczego, diety, aktywności fizycznej na komfort i długość życia.

Widoczny jest ogromny postęp w **diagnostyce** chorób, szczególnie ich nowych rodzajów i odmian o wyjątkowo ciężkim przebiegu i rokowaniu. Wysoka jakość badań z obszaru bioanalitiky to również ważny wkład badaczy w możliwość zaplanowania i wdrażania skutecznych metod **terapii i monitorowania jej przebiegu**. Dokonując oceny stanu wiedzy na świecie nt. udziału chemików analityków w diagnostyce różnych schorzeń, w tym również na poziomie komórkowym, widzimy ich ważny wkład we współpracy z klinicystami w opracowywaniu zaawansowanych metodologii. Wyniki takich badań mogą dostarczyć wielu informacji nt. dysfunkcji organizmu oraz pozwalają ocenić bezpieczeństwo sposobu leczenia, na każdym jego etapie.

Związki pochodzenia endogennego, syntezowane przez organizm zwykle w śladowych ilościach, oraz zażywane leki i tworzące się metabolity niosą wielowymiarowe informacje na temat stanu organizmu, zarówno na etapie diagnostyki, jak i terapii. Znajomość ich poziomów stężeń może ułatwić podjęcie decyzji o wdrożeniu leczenia, zanim pojawią się wyraźne objawy schorzenia. Pozwala również na dobór dawki leku lub zmianę jego rodzaju, oraz na ustalenie parametrów farmakokinetycznych dla skutecznej farmakoterapii.

Rola bioanalitiky w wykrywaniu markerów chorób, metabolitów związków egzo- i endogennych oraz interakcji między nimi, staje się jeszcze bardziej widoczna w ostatnich latach, szczególnie w światowych programach, dotyczących personalizacji terapii. W leczeniu spersonalizowanym, wiedza na temat farmakokinetyki leków i ich losów w organizmie pozwala lepiej kontrolować poszczególne etapy leczenia.

Z uwagi na duże zróżnicowanie budowy oznaczanych związków, występujących równocześnie w badanej próbce analitycznej, niskie poziomy ich stężeń oraz różnorodność matrycy (płyny ustrojowe, tkanki) należy dążyć do zastosowania szerokiego spektrum technik i metod analitycznych. W tego typach analizach stosuje się głównie metody separacyjne, np. chromatografię cieczową (LC), chromatografię gazową (GC), czy elektroforezę kapilarną (CE) z różnymi detektorami. Rozwijają się równolegle metody elektrochemiczne, które bazują na tańszym z reguły oprzyrządowaniu. W przypadku trudnych analiz z obszaru bioanalitiky, jest wskazane stosowanie różnych metod i technik, co pozwala na weryfikację poprawności oznaczeń. Dlatego nadal istotne jest poszukiwanie innowacyjnych narzędzi analitycznych, które odpowiedzą na wyzwania współczesnej medycyny.

Badania nad monitorowaniem leków i substancji endogennych w organizmach żywych prowadzone są w wielu ośrodkach w kraju, np. w UMK w Toruniu, PW i UW w Warszawie, UG, GUM i PG w Gdańsku, UJ w Krakowie, PŁ i UŁ w Łodzi, UMCS

w Lublinie, UwB i UMwB w Białymstoku i UO w Opolu. Prace wymienionych ośrodków można znaleźć w renomowanych czasopismach naukowych oraz w innych wydawnictwach, np. w książkach „Analiza Śladowa”, wyd. Malamut, Warszawa 2013 i w „Bioanalitika - w nauce i życiu”, wyd. PWN, Warszawa 2020.

Przedstawiony w publikacji materiał jest wynikiem współpracy Katedry Chemii Analitycznej Wydziału Chemicznego Politechniki Śląskiej z kardiologami Uniwersytetów Medycznych w kraju i za granicą.

### **1. TECHNIKI EKSTRAKCYJNE W BADANIACH NAD PRZYGOTOWANIEM PRÓBEK BIOLOGICZNYCH DO ANALIZY**

Opracowanie odpowiedniej metody przygotowania próbek biologicznych do analizy jest kluczowym etapem każdej procedury analitycznej. W literaturze znaleźć można wiele prac poświęconych temu zagadnieniu, jednak pomimo dużej wiedzy w tym zakresie, stale rozwijane są nowe, efektywne rozwiązania metodyczne do wydzielenia leków i ich metabolitów z materiału biologicznego [1-3].

Biorąc pod uwagę wymieniony nurt tematyczny, pierwszym etapem realizowanych w naszym zespole badań było opracowanie metod izolacji i wzbogacania analitów z próbek moczu oraz osocza, pobranych od pacjentów m.in. ze schorzeniami kardiologicznymi. Ze względu na skomplikowany charakter matrycy biologicznej, bezpośrednie oznaczanie analitów jest praktycznie niemożliwe. Wysokosprawne techniki separacyjne wymagają z reguły usunięcia substancji interferujących przed wykonaniem oznaczeń, stąd konieczne było usunięcie jak największej ilości potencjalnie przeszkadzających składników. Ponadto, poziomy stężenie leków i ich metabolitów w płynach ustrojowych są z reguły niskie, dlatego przed oznaczaniem konieczne było odpowiednie wzbogacenie analitu.

W badaniach do izolacji z moczu oraz z osocza skomplikowanych mieszanin związków, o różnych właściwościach fizyko-chemicznych, stosowano techniki ekstrakcyjne oparte na mechanizmach sorpcji. W tym celu opracowano dla badanych mieszanin związków procedury ekstrakcji do fazy stałej (SPE) [4, 5], mikroekstrakcji do upakowanego sorbentu (MEPS) [6-10], mikroekstrakcji kroplą rozpuszczalnika przez emulgację wspomaganą ultradźwiękami (USAEME) [11] i ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz wspomaganą wysalaniem (SALLE) [12] (Tabela 1). W niniejszych pracach prowadzono kompleksowe i systematyczne badania wpływu najważniejszych parametrów na efektywność zastosowanych procedur ekstrakcyjnych w układzie ciecz-ciało stałe, tj. SPE i MEPS (m.in. rodzaj sorbentu, objętość oraz rodzaj rozpuszczalnika stosowanego do elucji, pH i ilość próbki) oraz

w układzie ciecz–ciecz, tj. USAEME i SALLE (m.in. rodzaj oraz objętość ekstrahentu, rodzaj i ilość soli, pH i objętość próbki, czas ekstrakcji).

Nowatorstwo, a zarazem trudność opracowanej metodyki, wiązała się z koniecznością równoczesnej izolacji związków o zróżnicowanej polarności z zastosowaniem jednej, optymalnej procedury SPE. Uzyskane wyniki mogą stanowić bazę danych przy wstępnym wyborze sorbentów do ekstrakcji zarówno farmaceutyków rzadko stosowanych (aliskiren, prasugrel, riwaroksaban), jak i powszechnie stosowanych leków dostępnych bez recepty (np. ibuprofen, naproksen) z płynów biologicznych [5].

Inne badania opisane w pracach [6-10] potwierdzają, że zastosowanie MEPS prowadzi do efektywnej ekstrakcji szerokiej grupy leków i ich metabolitów, L-karnityny i jej estrowych pochodnych, do skrócenia i uproszczenia procedury w porównaniu do dotychczas stosowanych technik SPE [13]. Opracowane metody oparte na wykorzystywaniu procedury MEPS w połączeniu z szeroko dostępnym sposobem detekcji UV lub bardziej selektywnym MS/MS, posiadają duży potencjał aplikacyjny w analizie związków biologicznie aktywnych. Cechy tych opracowanych procedur sprawiły, iż izolacja analitów stała się bardzo szybka, łatwa do przeprowadzenia, ekonomiczna i można ją zaliczyć do nurtu „zielonej chemii”.

W pracy Magiera i Gülmez [11] zastosowano technikę mikroekstrakcji przez emulgację kroplą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami (USAEME) do izolacji ibuprofenu i jego metabolitów z próbek moczu. Opracowana procedura USAEME jest łatwa do wykorzystania w ekstrakcji i może być alternatywą do tradycyjnej ekstrakcji typu ciecz-ciecz (LLE). W pracy [11] zamieszczono tabelę, w której porównano opracowaną procedurę mikroekstrakcji oraz oznaczania ibuprofenu i jego metabolitów z innymi opisanymi dotychczas w literaturze i wykazano, że jest ona konkurencyjna w porównaniu do dotychczas opisanych metodyk.

Kolejną techniką ekstrakcji zastosowaną w prowadzonych badaniach była ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz wspomaganą wysalaniem (SALLE) [12]. Opracowana procedura ekstrakcji pozwoliła na bardzo dobre oczyszczenie matrycy, uzyskano również wysoki odzysk wszystkich analitów (wyższy niż 85%), przy zachowaniu krótkiego czasu przygotowania próbki. Użycie do ekstrakcji małych objętości rozpuszczalnika zdecydowanie zmniejszyło również ilość generowanych odpadów.

W realizowanych badaniach wykorzystano także zalety zastosowania metod statystycznych w planowaniu eksperymentu, a mianowicie określenie zależności między dobieranymi parametrami ekstrakcji i równoczesnego wpływu poszczególnych zmiennych na wynik analizy [6]. W celu selekcji parametrów ekstrakcji, które w sposób istotny wpływały na odzysk leków, zastosowano plan



eliminacyjny Placketta-Burmana, a otrzymane wyniki poddano analizie czynników głównych (PCA) oraz analizie skupień (CA). Badania udowodniły, że planowanie doświadczenia z wykorzystaniem metod statystycznych jest doskonałym narzędziem ułatwiającym dokonanie właściwego wyboru warunków izolacji analitów z próbek rzeczywistych [6].

W niektórych przypadkach próbki nie wymagały specjalnego przygotowania, wystarczyła jedynie precypitacja składników matrycy za pomocą metanolu lub acetonitrylu i wirowanie. W badaniach nad L-argininą i jej metabolitami konieczne było przeprowadzenie derywatywacji analitów. W tych badaniach po oczyszczeniu próbki techniką SPE dodawano aldehyd *o*-ftalowy i kwas merkaptopropionowy i bez usuwania wyżej wymienionej mieszaniny wprowadzano próbkę bezpośrednio do kolumny chromatograficznej [14].

## 2. ZASTOSOWANIE TECHNIK SEPARACYJNYCH I SPEKTRALNYCH W BADANIACH NAD OZNACZANIEM LEKÓW I ZWIĄZKÓW POCHODZENIA ENDOGENNEGO

W ramach realizowanych badań do oznaczania leków i związków pochodzenia endogennego zastosowano wysokosprawną i ultra-sprawną chromatografię cieczową (HPLC/UHPLC) w połączeniu z detektorami: spektrofotometrycznymi (UV, DAD), fluorescencyjnym (FL), amperometrycznym (ED) lub z tandemowym spektrometrem mas (MS/MS). W pracy [15] do analizy  $\beta$ -blokerów, izoflawonów i ich metabolitów wykorzystano chromatografię gazową sprzężoną ze spektrometrią mas (GC-MS).

**W Tabeli 1 zestawiono warunki chromatograficzne stosowane do oznaczania farmaceutyków z różnych grup terapeutycznych, ich metabolitów oraz związków polifenolowych i ich metabolitów, a w Tabeli 2 - wybranych związków endogennych.** Optymalne warunki rozdzielania chromatograficznego dobierano w oparciu na podstawowych informacjach na temat analitów (między innymi  $\log P$ ,  $pK_a$ ). W pracach [4-12, 16] opisano wyniki badań dotyczące wpływu rodzaju wypełnienia i temperatury kolumny, składu, natężenia przepływu, pH fazy ruchomej oraz programu elucji gradientowej na rozdzielczość analitów. Podstawą doboru parametrów było uzyskanie dobrego rozdzielania, czułości oraz powtarzalności, zachowując jednocześnie krótki czas analizy.

Rozdzielanie chromatograficzne prowadzono głównie z zastosowaniem sorbentów o małych cząstkach (sub-2  $\mu m$ ) (Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 [7, 11, 16] oraz kolumn typu core-shell Poroshell 120 EC-C18 [5, 6, 8, 9]. W pracach udowodniono wyjątkowo dobre właściwości kolumn otrzymanych w technologii opartej na sorbencie core-shell w zastosowaniu do oznaczania leków w próbkach biologicznych. Wypełnienie tej kolumny stanowi

stały nieporowaty rdzeń silikonowy o średnicy 1,7  $\mu\text{m}$ , na którym jest osadzona porowata warstwa krzemionki o grubości 0,5  $\mu\text{m}$ . Dzięki zastosowaniu tego typu wypełnienia kolumny możliwe było wykonywanie analiz w krótszym czasie, ograniczając przy tym zużycie drogich i szkodliwych rozpuszczalników organicznych. Korzyści, jakie uzyskano po zastosowaniu kolumny Poroshell, wynikają z ograniczenia między innymi dyfuzji wirowej i oporu przenoszenia masy. Osiągnięto ultra-wysokie sprawności, co wpłynęło z kolei na lepszą czułość metod. Na chromatogramach otrzymano wąskie, symetryczne i dobrze rozdzielone piki.

Oprócz tradycyjnych kolumn C18 w badaniach nad rozdzielaniem **enancjomerów wybranych  $\beta$ -blokerów** zastosowano kolumny z wypełnieniem enancjoselektywnym [17, 18]. Warunkiem rozdzielania enancjomerów w układzie chromatograficznym jest występowanie oddziaływań enancjoselektywnych. Między selektorem, a enancjomerami muszą wystąpić co najmniej trzy oddziaływania, z których jedno powinno zależeć od konfiguracji centrum stereogenicznego enancjomeru. Kompleks tworzony za pomocą trzech oddziaływań jest stabilniejszy, a silne wiązanie z selektorem wpływa na retencję enancjomeru. W badaniach zastosowano chiralną fazę stacjonarną Chiralcel OD-RH. Uzyskano dobre rozdzielanie enancjomerów karwedilolu i jego metabolitu 5'-hydroksyfenylkarwedilolu [17] oraz enancjomerów metoprololu i jego metabolitów ( $\alpha$ -hydroksymetoprololu, *O*-desmetylmetoprololu) [18]. Oznaczono je w moczu pacjentów leczonych wybranymi  $\beta$ -blokerami.

W ramach badań określano również wpływ składników fazy ruchomej na parametry chromatograficzne. Jako modyfikatory organiczne stosowano zarówno acetonitryl [5-9, 11], jak i metanol [16], a główny składnik fazy ruchomej stanowił wodny roztwór kwasu mrówkowego [7, 9, 11, 16] lub trifluoroctowego [5, 6, 8].

W celu uzyskania odpowiedniego rozdzielania leków i ich metabolitów prowadzono zarówno elucję izokratyczną, jak i gradientową. Zastosowanie elucji izokratycznej było możliwe w przypadku rozdzielania leków: riwaroksabanu, prasugralu oraz aliskirenu [7]. Dodatkową zaletą metody opisanej w tej publikacji był bardzo krótki czas analizy, który wynosi zaledwie 1,5 minuty [7].

Innym podejściem metodycznym do oznaczania leków z grupy  $\beta$ -blokerów i ich metabolitów było zastosowanie kolumn HILIC [12]. Przedmiotem pracy były badania podstawowe nad mechanizmem retencji analitów na różnych kolumnach HILIC (ZORBAX RRHD Plus Poroshell 120 HILIC, ZORBAX RRHD HILIC Plus, ACQUITY UPLC BEH HILIC, Acclaim HILIC-10, Luna HILIC) oraz w różnych warunkach analizy (badano wpływ zawartości acetonitrylu, natężenia przepływu fazy ruchomej, temperatury kolumny, stężenia roztworów octanu

i mrówczanu amonu, objętości dozowanej próbki, pH fazy ruchomej, rodzaju rozpuszczalnika organicznego) [12].

W kolejnych publikacjach opisano wyniki badań nad rozdzieleniem wybranych związków endogennych (L-karnityny i jej pochodnych oraz kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego) z zastosowaniem HPLC-MS/MS [4, 10]. Istotnym problemem prowadzonych badań opisanych w pracy [4] było uzyskanie retencji L-karnityny i jej acylowej pochodnej w odwróconym układzie faz. Wyniki badań opisane w tej pracy skłoniły zespół do dalszej pracy nad udoskonaleniem metody oznaczania potencjalnych biomarkerów z zastosowaniem chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). Zakres badawczy nad doбором warunków rozdzielania chromatograficznego poszerzono o siedem nowych, estrowych pochodnych L-karnityny [10]. Znacząca różnica w polarności L-karnityny i jej estrowych pochodnych implikuje dodatkowe trudności w opracowaniu metody ich równoczesnego oznaczania. W związku z powyższym przeprowadzono badania nad wpływem różnych czynników na selektywność opracowanej procedury z zastosowaniem kolumny Acquity UPLC BEH HILIC [10]. W dobranych warunkach chromatograficznych 9 analitów eluowało w czasie krótszym niż 2,5 minuty, a otrzymane na chromatogramie piki były symetryczne. Dla wszystkich związków współczynnik asymetryczności nie przekraczał 1,05, a uzyskana liczba pól była wysoka (rzędu 15000–550000). Poprawność uzyskanych wyników wskazuje na dużą potencjalną przydatność metody HILIC do rozdzielania L-karnityny i jej estrowych pochodnych, a użycie spektrometru mas może oczywiście rozszerzyć zakres zastosowania opracowanej procedury. Warto podkreślić, że opracowana metoda HILIC-MS/MS została po raz pierwszy zastosowana do oznaczania L-karnityny i jej pochodnych w próbkach moczu.

Związki endogenne, takie jak katecholaminy, indoloaminy i metyloksantyny, również rozdzielano i oznaczano z zastosowaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Z uwagi na charakter chemiczny związków stosowano chromatografię w odwróconym układzie faz, połączoną z trzema technikami detekcyjnymi: DAD, FL oraz ED [19-24].

W badaniach farmakokinetycznych tandemowy spektrometr mas jest cennym narzędziem do identyfikacji farmaceutyków w próbkach rzeczywistych. W pracach [4, 7, 9-11, 16] wykazano, że stanowi on selektywny i czuły detektor, który w połączeniu z technikami chromatograficznymi pozwala na analizę ilościową i jakościową badanych potencjalnych biomarkerów, leków oraz ich metabolitów. Aby przeprowadzić miarodajną analizę z zastosowaniem detektora MS/MS, konieczne były kompleksowe badania i określenie wpływu wielu zmiennych na intensywność sygnału pochodzącego od oznaczanego analitu [4, 7, 9-11, 16]. Pojedynczo dla każdego związku przebadano parametry charakterystyczne dla

poszczególnych analitów, natomiast dla oznaczanych mieszanin związków dobrano odpowiednie parametry źródła jonów. Praca w trybie MRM lub SRM umożliwiła uzyskanie bardzo dobrych wartości stosunku sygnału do szumu (S/N), a tym samym uzyskanie niskich granic wykrywalności i oznaczalności związków będących przedmiotem powyższych prac.

Innym ciekawym badaniem wykorzystującym spektrometrię mas było **wyznaczenie ścieżek metabolizmu wybranych leków**:  $\beta$ -blokerów [25] oraz leków nowej generacji [26] w układzie *in vitro* z zastosowaniem systemu ROXY<sup>TM</sup>. Dostosowanie odpowiednich warunków oraz parametrów eksperymentu, takich jak wartość potencjału, pH fazy ruchomej, rodzaj elektrody pracującej oraz temperatury reakcji, miało istotny wpływ na symulację metabolizmu oraz na rodzaj powstałych pochodnych. Interesujące wyniki otrzymane podczas badań w Katedrze Chemii Środowiska i Bioanalitiky UMK (dzięki uprzejmości Pana Profesora B. Buszewskiego) pokazały, że nowoczesny system ROXY sprzężony ze spektrometrią mas umożliwia symulację metabolizmu, tworząc jedną z alternatywnych metod badań *in vitro*.

Tabela 1. Techniki chromatograficzne w oznaczaniu wybranych leków i ich metabolitów w moczu i osoczach  
 Table 1. Chromatographic techniques for the determination of selected drugs and their metabolites in urine and plasma

Anality	Technika oznaczenia	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Technika ekstrakcji	LOQ	Odzysk (%)	Lit.
aliskiren, prasugrel, riwaroksaban, prednizolon, propranolol, ketoprofen, nifedypina, naproksen, terbinafina, ibuprofen, diklofenak, sildenafil, acenokumarol	UHPLC-UV	Poroshell120 EC-C18 (100 mm × 3,0 mm; 2,7 μm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 1,0 ml/min	SPE (C6H5)	0,009 – 0,650 μg/ml	85 – 105	[5]
ibuprofen, ketoprofen, diklofenak, aspiryna, naproksen, kwas salicylowy	UHPLC-UV	Poroshell120 EC-C18 (100 mm × 3,0 mm; 2,7 μm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,8 – 1,0 ml/min	MEPS (C18)	3,21–48,7 ng/ml	89 – 107	[6]
riwaroksaban, aliskiren, prasugrel	UHPLC-MS/MS	Zorbax RRHD SB-C18 (50 mm × 2,1 mm; 1,8 μm)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: acetonitryl Elucja izokratyczna (70:30; v/v) Przepływ: 0,8 ml/min	MEPS (C8)	5,0 pg/ml RIV, ALS 0,5 pg/ml PRS	95 – 102	[7]
milrinon, enalapril, karwedilol, spironolakton, acenokumarol, tiklopidyna, cilazapril, 2-oksoetiklopidyna, cilazaprilat, kanrenon, 5'-hydroksykarwedilol, O-desmetylokarwedilol, enalaprilat	UHPLC-UV	Poroshell120 EC-C18 (100 mm × 3,0 mm; 2,7 μm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,3 – 0,7 ml/min	MEPS (C18)	0,016 – 0,045 μg/ml	70 – 98	[8]

aliskiren, enalapril, enalaprilat	UHPLC-MS/MS	Poroshell 120 EC-C18 (100 mm × 2,1 mm; 2,7 µm)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,4 – 0,8 ml/min	mocz, osocze ludzkie MEPS (C8)	0,01 ng/ml	75 – 93	[9]
ibuprofen, 1-hydroksyibuprofen, 2-hydroksyibuprofen, 3-hydroksyibuprofen, karboksyibuprofen	UHPLC-MS/MS	Zorbax RRHD SB-C18 (50 mm × 2,1 mm; 1,8 µm)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 1,0 ml/min	USAEME (1-oktanol)	0,5 pg/ml	91 – 104	[11]
metoprolol, karwedilol, propranolol, O-desmetylmetoprolol, α-hydroksymetoprolol, 5'-hydroksykarwedilol, O-desmetylokarwedilol, 5-hydroksypropranolol	UHPLC-UV	Poroshell 120-HILIC (100 mm × 3,0 mm; 2,7 µm)	A: acetonitryl B: 10 mM octan amonu w wodzie (pH=7,5) Elucja izokratyczna (85:15; v/v) Przepływ: 0,8 ml/min	SALLE ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ )	0,1 – 0,2 µg/ml	83 – 104	[12]
23 związki (β-blokery i metabolity, flawonoidy i metabolity)	GC-MS	P-5-MS (30 m × 0,25 mm; 0,25 µm)	hel Przepływ: 1,2 ml/min	HE + SPE + DE (HE: β-glukuronidaza/ sulfataza; SPE: Oasis HLB; DE: MSTFA)	1,8 – 23,3 ng/ml	70 – 100	[15]
sotalol, metoprolol, propranolol, karwedilol, nifedypina, kaptopryl, cilazapril, milirmon, tiklopidyna, furosemid, kwas acetylosalicylowy, kwas salicylowy, ibuprofen, naproksen, ketoprofen, diklofenak, paracetamol, dipyron, mildronat, sildenafil, deksametazon, karbamazepina, terbinafina	UHPLC-MS/MS	Zorbax RRHD SB-C18 (50 mm × 2,1 mm; 1,8 µm)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: metanol Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 0,6 ml/min	PP (acetonitryl, metanol)	0,05–0,6 ng/ml	91 – 109	[16]

enancjomery karwedliolu i jego metabolitu (5'-hydroksykarwedilolu)	HPLC-FL	CHIRALCEL® OD-RH (150 mm × 4,6 mm; 5 µm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie + 0,05% dietyloamina w wodzie (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,3 – 1,0 ml/min	PP + SPE (PP: metanol, acetonitryl; SPE: Oasis HLB)	14,2 – 24,2 ng/ml	79 – 108	[17]
enancjomery metoprololu i metabolitów (α-hydroksymetoprololu, O-desmetylmetoprololu)	HPLC-FL	CHIRALCEL OD-RH (150 mm × 4,6 mm; 5 µm)	A: 0,2% dietyloamina w wodzie (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 0,8 ml/min	SPE (Oasis HLB)	0,025 µg/ml	68	[18]
52 związki (β-blokery i metabolity, flawonoidy i metabolity)	UHPLC-MS/MS	Hypersil GOLD™ (100 mm × 2,1 mm; 1,9 µm)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,65 – 0,7 ml/min	HE (β-glukuronidaza/ sulfataza)	0,01 – 40 ng/ml	92 – 103	[27]
22 związki β-blokery i metabolity, izoflawony i metabolity,	UHPLC-UV	Hypersil GOLD™ (50 mm × 2,1 mm; 1,9 µm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,3 – 0,8 ml/min	HE + SPE (HE: β-glukuronidaza/ sulfataza; SPE: Oasis HLB)	32,2 – 236 ng/ml	69 – 102	[28]
sotalol, metoprolol, propranolol, karwedliol, kwas salicylowy, deksametazon, prednizolon, ketoprofen, katechina, epikatechina, rutyna, hesperydyna, neohesperydyna, kwercetyna, naringenina, hesperetyna	UHPLC-UV	Chromolith1 Fast Gradient Monolithic C18e (50 mm × 2 mm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 1,5 – 2,5 ml/min	PP + SPE (PP: metanol, acetonitryl; SPE: SDB + C18)	0,02 – 0,07 µg/ml	76 – 101	[29]

<p>imipenem, paracetamol, dipyron, wankomycyna, flukonazol, cefazolin, prednizolon, deksametazon, furosemid, ketoprofen, amikacyna</p>	<p>HPLC-DAD/FL</p>	<p>LiChroCART® Purospher® STAR, RP-18e (125 mm × 3,0 mm; 5 µm)</p>	<p>A: metanol B: acetonitryl C: 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie Elucja gradientowa Przeptyw: 0,65 – 0,75 ml/min (A) acetonitryl (B) bufor (kwas octowy/octan sodu, pH 4,66) (C) 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie Elucja gradientowa Przeptyw: 1,0 – 1,3 ml/min</p>	<p>PP (acetonitryl, metanol) DE</p>	<p>0,03 – 3,75 µg/ml</p>	<p>96 – 104</p>	<p>[30]</p>
<p>sildenafil, N-desmetylo-sildenafil, imipenem, paracetamol, dipyron, wankomycyna, flukonazol, cefazolin, prednizolon, ketoprofen, deksametazon, furosemid,</p>	<p>HPLC-DAD/FL</p>	<p>LiChroCART® Purospher® STAR (125 mm × 3,0 mm; 5 µm)</p>	<p>(A) acetonitryl (B) bufor (kwas octowy/octan sodu, pH 4,66) (C) 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie Elucja gradientowa Przeptyw: 1,0 – 1,3 ml/min</p>	<p>LLE (octan etylu: dichlorometan: chloroform; 45:30:20; v/v/v)</p>	<p>0,02 – 3,45 µg/ml</p>	<p>59 – 99</p>	<p>[31]</p>
<p>sildenafil, enalapril, paracetamol, sotalol, dipyron, wankomycyna, kaptopril, flukonazol, cefazolin, metoprolol, aspiryna, tiklopidyna, prednizolon, propranolol, digoksin, furosemid, deksametazon, karvedilol, ketoprofen, nifedypina, terbinafina, acenokumarol, spironolakton</p>	<p>DAD / FL</p>	<p>LiChroCART® Purospher® STAR RP-18e (250 mm × 4 mm; 5 µm)</p>	<p>(A) metanol (B) acetonitryl (C) 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie Elucja gradientowa Przeptyw: 1,0 – 1,4 ml/min</p>	<p>PP (acetonitryl, metanol)</p>	<p>0,05 – 4,45 µg/ml</p>	<p>94 – 106</p>	<p>[32]</p>
<p>sotalol, metoprolol, α-hydroksymetoprolol, paracetamol i jego glukuronowe i siarzanowe pochodne</p>	<p>HPLC-DAD/FL</p>	<p>LiChroCART C18e (125 mm × 3 mm; 5 µm)</p>	<p>A: 0,05% kwas trifluoroctowy (B) acetonitryl (C) metanol Elucja gradientowa Przeptyw: 0,7 – 0,85 ml/min</p>	<p>PP (acetonitryl, metanol)</p>	<p>0,6 – 4,95 µg/ml</p>		<p>[33]</p>



Tabela 2. Techniki chromatograficzne w oznaczaniu wybranych związków endogennych oraz w mieszaninach z lekami i witaminami  
 Table 2. Chromatographic techniques for the determination of selected endogenous compounds and in mixtures with drugs and vitamins

Anality	Technika oznaczania	Faza stacjonarna	Faza ruchoma	Technika ekstrakcji	LOQ	Odzysk (%)	Lit.
L-karnityna, acetylo-L-karnityna, kwas $\alpha$ - ketoglutarowy	HPLC-MS/MS	Acclaim 120 C8 column (150 mm $\times$ 4,6 mm; 3,0 $\mu$ m)	A: 0,1% kwas mrówkowy w wodzie B: acetonitryl Elucja izokratyczna (97:3; v/v) Przepływ: 1,2 ml/min	SPE (żel krzemionkowy)	0,8 ng/ml $\alpha$ -KG 0,08 ng/ml L- CAR 0,04 ng/ml acetyl-L-CAR	86 – 106	[4]
L-karnityna, acetylokarnityna, propionylkarnityna, heksanilokarnityna, oktanilokarnityna, dekanylokarnityna, laurylokarnityna, myristonylokarnityna, palmitonylokarnityna	UHPLC-MS/MS	UPLC BEH HILIC (75 mm $\times$ 2,1 mm; 1,7 $\mu$ m)	A: 5 mM octan amonu w wodzie B: acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 1,0 ml/min	MEPS (M1: SCX + C8)	0,1 ng/ml	70 – 110	[10]
L-arginina, L-glutamina, N-hydroksy-L-arginina, L-cytrulina, N-monometylo-L-arginina, L-homoarginina, asymetryczna N,N-dimetylo-L-arginina, symetryczna N,N-dimetylo-L-arginina, L-ornityna, putrescyna, agmatyna, spermidyna, spermina	HPLC-FL	LiChroCART <sup>®</sup> Purospher <sup>®</sup> STAR RP-18e (250 mm $\times$ 4,0 mm; 5 $\mu$ m)	(A) bufor fosforanowy (pH=6,88) (B) metanol (C) acetonitryl Elucja gradientowa Przepływ: 1,0 – 1,3 ml/min	SPE (Oasis MCX) DE	0,17 – 655 pM / 20 $\mu$ l próbki	82 – 94	[14]
DA, DOMA, E, HVA, MHPG, MN, NMN, 5HT, 5HIAA, cefazolin, flukonazol, furosemid, metamilol, paracetamol	HPLC-DAD-FL	LiChroCARD Purospher RP18e (125 mm $\times$ 3,0 mm; 5 $\mu$ m)	A: bufor octanowy (pH=4,66) B: metanol Elucja gradientowa Przepływ: 0,5 – 1,0 ml/min	SPE (C18e)	24 – 300 ng/ml	73 – 100	[19]
DA, DOMA, E, HVA, MHPG, MN, NMN, 5HT, 5HIAA, BI,	HPLC-DAD-FL	LiChroCARD Purospher RP18e	A: bufor octanowy (pH=4,66) B: metanol	SPE (C18)	24 – 300 ng/ml	73 – 100	[20]

B2, B3, B6, B12, C		(125 mm × 3,0 mm; 5 µm)	Elucja gradientowa Przeptyw: 0,5 – 1,0 ml/min			
L-DOPA, DA, DOMA, E, HVA, MHPG, MN, NMN, 5HT, 5HIAA	HPLC-FL	LiChroCARD Purospher RP18e (125 mm × 3,0 mm; 5 µm)	A: bufor octanowy (pH=4,66) B: metanol Elucja gradientowa Przeptyw: 0,5 – 1,0 ml/min	PP	24 – 30 ng/ml	71 – 100 [21]
13DMU, IMX, 3MX, CAFF, THPH, cefazolin, deksametazon, furosemid, imipenem, paracetamol, prednizolon	HPLC-DAD-FL	LiChroCARD Purospher RP18e (125 mm × 3,0 mm; 5 µm)	A: 0,05% kwas trifluoroctowy w wodzie B: acetonitryl Elucja gradientowa Przeptyw: 0,8 ml/min	SPE (C18)	50 – 100 ng/ml	75 – 102 [22]
DA, E, NE, 3MT, MN, NMN, VMA, HVA, DOPAC, DHPG, MHPG, 5HT, 5HIAA	HPLC-FL-ED	2 × Chromolith RP-18e (100 mm × 4,6 mm)	A: bufor octanowy (pH=4,66) B: metanol Elucja izokratyczna (97:3; v/v) Przeptyw: 0,8 ml/min	SPE (Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,3 – 30 ng/ml	70 – 93 [23]
DA, E, NE, 3MT, MN, NMN, VMA, HVA, DOPAC, DOMA, DHPG, MHPG, 5HT, 5HIAA	HPLC-FL	Chromolith RP-18e (100 mm × 4,6 mm)	A: bufor cytrynianowy (pH=2,0) B: metanol Elucja gradientowa Przeptyw: 0,6 – 0,84 ml/min	SPE (C18e)	24 – 30 ng/ml	75 – 92 [24]

### 3. TECHNIKI WOLTAMPEROMETRYCZNE W ANALIZIE MATERIAŁU KLINICZNEGO

Metody elektroanalityczne, mimo iż nie wymagają drogiej aparatury oraz zapewniają szybkie i dokładne pomiary, są stosowane stosunkowo rzadko w analizie klinicznej. Jedną z przyczyn jest fakt, że tylko niektóre związki wykazują aktywność elektrochemiczną, będącą warunkiem uzyskania sygnału w metodach elektroanalitycznych. Ponadto, pozostałości matrycy próbek rzeczywistych mogą wykazywać elektroaktywność, co utrudnia analizy. Aby zminimalizować wpływ matrycy na otrzymany wynik, próbki moczu oczyszczano przez strącanie białek, ekstrakcję do fazy stałej lub ekstrakcję ciecz-ciecz [34-36]. W Tabeli 3 zebrano dane dotyczące parametrów oznaczania badanych przez nas leków technikami woltamperometrycznymi.

Tabela 3. Parametry oznaczeń badanych leków technikami woltamperometrycznymi

Table 3. Parameters of determination of tested drugs by voltammetric techniques

Lp.	Analit	Technika	Elektroda pracująca	Elektroda odniesienia	Elektrolit	Zakres potencjałów [V]	Zakres oznaczalności	Przygotowanie próbki	Lit.
1.	paracetamol, furosemid, dipyron, cefazolina, deksametazon	DPV	HMDE, grafitowa	Ag/AgCl	bufor Brittona – Robinsona pH=2,4	0,0 – 1,25 -0,3 – -1,0	0,51–66,1 μM	PP + SPE + LLE (PP: acetonitryl; SPE: NH <sub>2</sub> ; LLE: octan etylu)	[34]
2.	paracetamol, karwedilol, sildenafil	CV, DPV	GCE	Ag/AgCl	bufory Brittona – Robinsona o pH=3,26 i 2,09	-0,5 – 1,5	2,5 – 45,0 μg/ml	PP + SPE (PP: acetonitryl; SPE: Oasis MCX)	[35]
3.	propranolol, dwa jego metabolity	CV, DPV	GCE GCE/MW CNTs	Ag/AgCl	bufor Brittona – Robinsona pH=3,0	-0,5 – 1,5	$3,25 \cdot 10^{-6}$ – $1,35 \cdot 10^{-4}$ M	PP + SPE (PP: acetonitryl; SPE: Oasis HLB)	[36]
4.	paracetamol, dwa jego metabolity	CV	GCE	Ag/AgCl	bufory Brittona – Robinsona o pH od 1,81 do 7,24	-0,5 – 1,6	$2,17 \cdot 10^{-5}$ – $1,65 \cdot 10^{-4}$ M	roztwory modelowe	[37]

#### 4. ZASTOSOWANIE OPRACOWANYCH METOD DO OZNACZANIA WYBRANYCH LEKÓW, ICH METABOLITÓW I SUBSTANCJI EDNOGENNYCH W PŁYNACH USTROJOWYCH

W celu monitorowania terapii opisane procedury analityczne zastosowano do wykrywania i oznaczania leków oraz ich metabolitów, w płynach ustrojowych pacjentów leczonych na oddziałach kardiologicznych i neurologicznych. Badania na materiałach biologicznych przeprowadzono po uzyskaniu zgody Komisji Bioetycznej.

W pracach przedstawiono wyniki otrzymane po analizie próbek biologicznych pobranych od osób zażywających niesteroidowe leki przeciwzapalne (ibuprofen, paracetamol, naproksen) [5, 6, 11, 16],  $\beta$ -blokery (karwedilol, metoprolol, propranolol) [5, 8, 16], nowy lek stosowany w terapii objawowej żyłnej choroby zatorowo-zakrzepowej (riwaroksaban) [7], lek będący blokerem receptora aldosteronowego (spironolakton) [8], oraz lek należący do grupy inhibitorów konwertazy angiotensyny (enalapril) [8, 9]. Ponadto, opracowane metody pozwoliły na oznaczenie metabolitów propranololu, karwedilolu, tiklopidyny, enalaprilu, spironolaktonu, aspiryny, paracetamolu oraz ibuprofenu. Próbkę moczu były pobierane od pacjentów w różnych odstępach czasu od podania leku [6].

Opracowaną procedurę USAEME-UHPLC-MS/MS po raz pierwszy zastosowano do oznaczania ibuprofenu i jego czterech metabolitów [11]. Wyniki uzyskane podczas monitorowania stężenia leków i ich metabolitów w różnych odstępach czasu od doustnego podania leku wykorzystano do określenia profilu zmiany stężenia ibuprofenu i jego metabolitów w zależności od czasu [11].

W innej pracy zidentyfikowano niebadane do tej pory metabolity riwaroksabanu [7]. W literaturze tylko w jednej publikacji autorzy podali informacje na temat potencjalnych produktów biotransformacji riwaroksabanu, które mogą występować w próbkach osocza ludzkiego [38]. Ze względu na brak komercyjnie dostępnych wzorców niemożliwe było przeprowadzenie analizy ilościowej wykrytych w moczu związków. Dodatkowo w badaniach zastosowano program Lightsight<sup>TM</sup>, który za pomocą specjalnego algorytmu umożliwił znalezienie metabolitów oraz znacznie przyspieszył i ułatwił proces profilowania powstających pochodnych. Za pomocą tego programu potwierdzono obecność wszystkich zidentyfikowanych w trybie MRM metabolitów riwaroksabanu.

Oprócz leków w próbkach moczu i osocza równocześnie oznaczono także związki polifenolowe i ich metabolity, by następnie porównać ich wpływ na zmiany stężeń leków po stosowaniu zwykłej diety i po wprowadzeniu dodatkowych produktów bogatych w polifenole [15, 27-29]. Przykładowe wyniki analiz próbek moczu na zawartość propranololu i jego metabolitu wskazują, iż stężenie leku

w moczu wzrasta po zastosowaniu diety bogatej w przeciwutleniacze, oraz suplementów diety. Ponadto, w moczu pacjentów spożywających duże ilości produktów bogatych w polifenole oznaczono mniej metabolitu (4-hydroksypropranololu) w porównaniu z próbkami moczu pobranymi od pacjentów stosujących zwykłą dietę. Otrzymane wyniki jednoznacznie wskazują na konieczność monitorowania stężenia  $\beta$ -blokerów w płynach ustrojowych pacjentów w przypadku równoczesnego spożywania flawonoidów, gdyż zmienia się w sposób istotny metabolizm leków.

Procedury analityczne, opisane w pracy [4, 10], zastosowano w badaniach nad poszukiwaniem potencjalnych markerów chorób kardiologicznych. Wyniki otrzymane po analizie próbek pochodzących od pacjentów pozwoliły jednoznacznie stwierdzić, że jest możliwe wykorzystanie opracowanej metody UHPLC-MS/MS do oznaczania L-karnityny, jej acetylowej pochodnej i kwasu  $\alpha$ -ketoglutazarowego do badań przesiewowych [4]. Co więcej, druga opracowana metoda HILIC-UHPLC-MS/MS do równoczesnego oznaczania L-karnityny i jej sześciu estrowych pochodnych może dostarczyć bardziej szczegółowych informacji na temat zmian w układzie sercowo-naczyniowym [10].

W leczeniu wielu chorób ważną rolę odgrywają aminy biogenne z grupy katecholamin i indoloamin (dopamina, serotonina) oraz metyloksantyny (teofilina, teobromina, kofeina). Są one stosowane samodzielnie jako leki, lub w połączeniu z innymi substancjami tak, aby wspierać i wzmacniać działanie - np. połączenie kofeiny i paracetamolu. Integralną częścią procesu leczenia może być również suplementacja witaminowa. Opracowane procedury chromatograficzne umożliwiają rozdzielanie i oznaczanie związków endogennych z grup katecholamin, indoloamin, metyloksantyn oraz witamin rozpuszczalnych w wodzie, jak również wybranych leków (przeciwbólowych, moczopędnych, antybiotyków) [19-24]. Procedury służą nie tylko do oznaczenia związków głównych (dopamina, serotonina, kofeina), lecz również ich metabolitów. Wiąże się to z koniecznością posiadania układu dającego sygnał analityczny w szerokim zakresie stężeń. Zastosowanie połączenia szeregowego dwóch detektorów umożliwiło oznaczanie analitów na różnych poziomach stężeń, bez konieczności dodatkowego rozcieńczania/zatężania próbki [19, 20, 22-24].

Opracowane procedury do wydzielenia i oznaczania amin biogennych stosowano w przypadku analiz moczu pacjentów po zabiegach kardiochirurgicznych i pacjentów będących w trakcie terapii choroby Parkinsona. Procedury do oznaczania metyloksantyn, jak również metyloksantyn obok innych leków, wykorzystano do analizy moczu pacjentów oddziału intensywnej opieki medycznej, chorych na astmę [19-24].

W ostatnim czasie nastąpił duży postęp w leczeniu chorych cierpiących na nadciśnienie płucne. Wprowadzenie do leczenia NO umożliwiło przeżycie wielu chorych z ciężkimi zespołami nadciśnienia płucnego w okresach noworodkowym i około operacyjnym. Lek ten jednak, ze względu na istotną toksyczność przy długoterminowym stosowaniu, nie znalazł zastosowania u pacjentów z przewlekłym nadciśnieniem płucnym. Wprowadzona do leczenia nadciśnienia płucnego L-arginina daje nadzieję na podobny postęp w leczeniu chorych z przewlekłym nadciśnieniem płucnym.

L-arginina wspomaga także wytwarzanie hormonu wzrostu, stymulując rozwój i czynność grasicy, stymuluje laktację, oraz przyczynia się do optymalnego zwiększenia masy mięśni i kolagenu, dzięki czemu jest chętnie stosowana przez kulturystów jako naturalny suplement diety.

Otrzymane wyniki wskazują, iż przedstawione powyżej rozwiązania metodyczne z zastosowaniem technik separacyjnych i spektralnych mogą stanowić narzędzie do monitorowania stężeń leków i ich metabolitów oraz związków pochodzenia endogennego w próbkach rzeczywistych. Czułość i selektywność opracowanych procedur analitycznych otrzymana po odpowiednim doborze zarówno parametrów ekstrakcji analitów, jak ich oznaczania, była wystarczająca, by w przypadku każdej próbki rzeczywistej móc oznaczyć anality z dobrą precyzją i dokładnością.

Kontrola stężenia leków i ich metabolitów w rzeczywistym czasie leczenia jest jedną z najefektywniejszych metod personalizacji terapii, uwzględniającej indywidualne cechy pacjenta oraz ewentualne oddziaływania farmaceutyków z innymi związkami. Wielość oznaczanych związków, złożony skład matrycy oraz wymagane niskie granice oznaczalności powodują stałe zapotrzebowanie w dziedzinie analityki medycznej na odpowiednie procedury analityczne. W literaturze nadal pojawiają się prace z tej tematyki badawczej. Potwierdza to fakt, iż rozwój czułych i selektywnych procedur analitycznych stosowanych w oznaczaniu leków i ich metabolitów oraz innych związków biologicznie aktywnych jest nadal aktualnym nurtem badawczym [39-41].

## UWAGI KOŃCOWE

Przedstawione w artykule metody przygotowania próbek biologicznych do badań, jak również oznaczeń leków, ich metabolitów lub związków wydzielania wewnętrznego mogą ułatwić innym badaczom opracowanie metodologii do badań nad nowymi lekami lub przy opracowywaniu procedur w diagnostyce multiparametralnej. Opisane metody mogą być w niektórych przypadkach bezpośrednio aplikowane do nowych potrzeb terapii, zarówno w zakresie śledzenia metabolizmu leków, jak i badań ich farmakokinetyki. Inne z opisanych metod będą wskazówką w kwestiach wyboru

metody wydzielania analitów z próbek, doboru odpowiednich sorbentów, typu oprzyrządowania lub planowania procedur.

Dorobek naszego zespołu w przedstawionej tematyce może być zachętą i zaproszeniem do wymiany doświadczeń z badaczami z innych ośrodków akademickich, którzy zajmują się bioanalitiką i dziedzinami pokrewnymi.

#### PIŚMIENNICTWO CYTOWANE

- [1] Z. Niu, W. Zhang, Ch. Yu, J. Zhang, Y. Wen, *TrAC*, 2018, **102**, 123.
- [2] I.E. Mikhail, M. Tehranirokh, A.A. Gooley, R.M. Guijt, M.C. Breadmore, *J. Chromatogr. A*, 2021, **1646**, 462086.
- [3] J.S. da Silva Burato, D.A.V. Medina, A.L. de Toffoli, E.V.S. Maciel, F.M. Lanças, *J. Sep. Sci.*, 2020, **43**, 202.
- [4] S. Magiera, I. Baranowska, J. Kusa, J. Baranowski, *J. Chromatogr. B*, 2013, **919–920**, 20.
- [5] S. Magiera, J. Hejnyak, J. Baranowski, *J. Chromatogr. B*, 2014, **958**, 22.
- [6] S. Magiera, Ş. Gülmez, A. Michalik, I. Baranowska, *J. Chromatogr. A*, 2013, **1304**, 1.
- [7] S. Magiera, *J. Chromatogr. B*, 2013, **938**, 86.
- [8] S. Magiera, I. Baranowska, *J. Sep. Sci.*, 2014, **37**, 3314.
- [9] S. Magiera, J. Kusa, *J. Chromatogr. B*, 2015, **980**, 79.
- [10] S. Magiera, J. Baranowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, **109**, 171.
- [11] S. Magiera, Ş. Gülmez, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2014, **92**, 193.
- [12] S. Magiera, A. Kolanowska, J. Baranowski, *J. Chromatogr. B*, 2016, **1022**, 93.
- [13] G. Alves, M. Rodrigues, A. Fortuna, A. Falcão, J. Queiroz, *Bioanalysis*, 2013, **5**, 1409.
- [14] P. Markowski, J. Baranowski, I. Baranowska, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **605**, 205.
- [15] S. Magiera, C. Uhlschmied, M. Rainer, Ch.W. Huck, I. Baranowska, G.K. Bonn, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, **56**, 93.
- [16] S. Magiera, I. Baranowska, *J. AOAC Int.*, 2014, **97**, 1526.
- [17] S. Magiera, W. Adolf, I. Baranowska, *CEJC*, 2013, **11**, 2078.
- [18] I. Baranowska, W. Adolf, S. Magiera, *J. Chromatogr. B*, 2015, **1004**, 79.
- [19] I. Baranowska, J. Płonka, *Biomed. Chromatogr.*, 2016, **30**, 652.
- [20] I. Baranowska, J. Płonka, *J. Liq. Chromatogr. R T*, 2008, **31**, 2974.
- [21] I. Baranowska, J. Płonka, *J. Chromatogr. Sci.*, 2008, **46**, 30.
- [22] I. Baranowska, J. Płonka, J. Baranowski, *Chem. Anal. (Warsaw)*, 2006, **51**, 751.
- [23] M. Zydróż, J. Baranowski, J. Białkowski, I. Baranowska, *Sep. Sci. Tech.*, 2005, **40**, 3137.
- [24] I. Baranowska, M. Zydróż, *J. Separation Sci.*, 2003, **26**, 614.
- [25] M. Szultka-Młyńska, S. Bajkacz, I. Baranowska, B. Buszewski, *Talanta*, 2018, **176**, 262.
- [26] M. Szultka-Młyńska, S. Bajkacz, M. Kaca, I. Baranowska, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B*, 2018, **1093–1094**, 100.
- [27] S. Magiera, I. Baranowska, J. Kusa, *Talanta*, 2012, **89**, 47.
- [28] I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, *J. Chromatogr. B*, 2011, **879**, 615.
- [29] I. Baranowska, S. Magiera, J. Baranowski, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.*, 2011, **34**, 421.
- [30] I. Baranowska, P. Markowski, *J. Anal. Chim. Acta*, 2006, **570**, 46.
- [31] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, *J. Rycaj, Chem. Anal.*, 2007, **52**, 645.
- [32] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski, *Anal. Sci.*, 2009, **25**, 1307.
- [33] I. Baranowska, A. Wilczek, *Anal. Sci.*, 2009, **25**, 769.
- [34] I. Baranowska, P. Markowski, A. Gerle, *Bioelectrochemistry*, 2008, **73**, 5.
- [35] I. Baranowska, M. Koper, P. Markowski, *Chem. Anal.*, 2008, **53**, 967.
- [36] I. Baranowska, M. Koper, *J. Braz. Chem. Soc.*, 2011, **22**, 1601.

- [37] I. Baranowska, M. Koper, *Electroanalysis*, 2009, **21**, 1194.
- [38] D. Lang, C. Freudenberger, C. Weinz, *DMD* 2009, **37**, 1046.
- [39] R.P. Bhole, S.R. Jagtap, K.B. Chadar, Y.B. Zambare, *J. Pharm. Technol.* 2020, **13**, 505.
- [40] M.R. Siddiqui, Z.A. AlOthman, N. Rahman, *Arabian J. Chem.* 2017, **10**, S1407.
- [41] Y.S. Caro, M.S. Cámara, M.M. De Zan, *Talanta* 2020, **210**, 120619.

Praca wpłynęła do Redakcji 17 maja 2021 r.