



**Anna Weronika Sobańska**

**AUTOREFERAT**

**Chromatograficzne (RP-18) i fizykochemiczne podstawy  
prognozowania zdolności przekraczania bariery krew-mózg przez leki  
i inne związki chemiczne**

**Uniwersytet Medyczny w Łodzi**

**Wydział Farmaceutyczny**

**Katedra Chemii Medycznej**

**Zakład Chemii Analitycznej**

Łódź 2019

## **Spis treści**

1. Imię i nazwisko.....	3
2. Informacje o uzyskanych dyplomach i stopniach naukowych.....	3
3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych.....	3
4. Osiągnięcie naukowe.....	3
<i>wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r. poz. 1789).....</i>	<i>3</i>
4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego.....	3
4.2. Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako osiągnięcie postępowania habilitacyjnego.....	4
4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników.....	5
4.3.1. Wprowadzenie.....	5
4.3.2. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego.....	7
4.3.3. Podsumowanie.....	31
5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i dydaktycznych.....	37
5.1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego.....	37
5.2. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora.....	37
5.3. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora.....	39
5.4. Działalność dydaktyczna, organizacyjna i pozostałe osiągnięcia.....	47
Literatura.....	50

## 1. Imię i nazwisko

Anna Weronika Sobańska

## 2. Informacje o uzyskanych dyplomach i stopniach naukowych

1997 – doktor filozofii w zakresie chemii (DPhil in Chemistry), Uniwersytet w Oksfordzie, Stopień naukowy zatwierdzony przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej (1998) jako stopień doktora nauk chemicznych w zakresie chemii

Tytuł pracy doktorskiej: ‘Application of the Glyoxylate Ene Reaction to Natural Product Synthesis’

Promotor – Dr Jeremy Robertson, Dyson Perrins Laboratory, Oxford University, UK

1992 – magister inżynier chemik (z wyróżnieniem), Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

Tytuł pracy magisterskiej: „Synteza i struktura arylowych pochodnych 1,3,5-triazyny i 1,3-pirymidyny”

Promotorzy – Prof. dr hab. Marek L. Główka (Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej PŁ, Dr Zbigniew Kamiński (Instytut Chemii Organicznej PŁ)

## 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 2013	Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Chemii Analitycznej, adiunkt
2005 - 2013	Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Zakład Chemii Analitycznej, asystent
1998 - 2005	Fabryka Kosmetyków Pollena-Ewa S.A. w Łodzi, Dział Badawczo-Rozwojowy, Specjalista ds. Rozwoju
1996 - 1997	Akademia Medyczna w Łodzi, Zakład Chemii Analitycznej, asystent

## 4. Osiągnięcie naukowe

wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017r. poz. 1789)

### 4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego

**Chromatograficzne (RP-18) i fizykochemiczne podstawy prognozowania zdolności przekraczania bariery krew-mózg przez leki i inne związki chemiczne.**

Podstawę ubiegania się o stopień doktora habilitowanego stanowi cykl 8 publikacji (w tym 6 oryginalnych i 2 przeglądowe) o łącznym współczynniku oddziaływania (IF) równym **14,569** i wartości punktacyjnej MNiSW **179**, opublikowanych w latach 2014-2019.

#### **4.2. Wykaz monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako osiągnięcie postępowania habilitacyjnego**

[P-1] Application of planar chromatographic descriptors to the prediction of physico-chemical properties and biological activity of compounds. Sobańska A.W. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **41**, 255-271 (2018)

IF – 0,827; MNiSW - 15

[P-2] Evaluation of the lipophilicity of selected sunscreens – A chemometric analysis of thin-layer chromatographic retention data. Sobańska A.W., Wójcicka K., Brzezińska E. *J. Sep. Sci.* **37**, 3074-3081 (2014)

IF – 2,737; MNiSW - 30

[P-3] Phospholipid-based immobilized artificial membrane (IAM) chromatography: A powerful tool to model drug distribution processes. Sobańska A.W., Brzezińska E. *Curr. Pharm. Des.* **23**, 6784 – 6794 (2017)

IF – 2,757; MNiSW - 30

[P-4] Comparative (Q)SAR analysis of benzodiazepine derivatives with different biological activity. Sobańska A.W., Żydek G., Włodno P., Brzezińska E. *Eur. J. Med. Chem.* **89**, 147-155 (2015)

IF – 3,902; MNiSW – 40

[P-5] Application of RP-18 Thin-Layer Chromatography and Quantitative Structure-Activity Relationship Analysis for the Prediction of the Blood-Brain Barrier Permeation. Sobańska A.W., Brzezińska E. *J. Planar Chromatogr.* **29**, 287-298 (2016)

IF – 0,736; MNiSW – 15

[P-6] RP-18 Chromatographic-Based Study of the Blood-Brain Barrier Permeability of Selected Sunscreens and Preservatives. Pyzowski J., Brzezińska E., Sobańska A.W. *J. Planar Chromatogr.* **30**, 275-284 (2017)

IF – 0,459; MNiSW - 15

[P-7] Prediction of the Blood-Brain Barrier Permeability Using RP-18 Thin Layer Chromatography. Sobańska A.W., Wanat K., Brzezińska E. *Open Chem.* **17**, 43-56 (2019)

IF (2017) – 1,425 ; MNiSW - 14

[P-8] RP-18 HPLC Analysis of Drugs' Ability to Cross the Blood-Brain Barrier. Sobańska A.W., Hekner A., Brzezińska E. *J. Chem.* Article ID 5795402 (2019)

IF (2017) – 1,726; MNiSW - 20

*Opis indywidualnego wkładu habilitanta w powstanie każdej z wieloautorskich publikacji znajduje się w Załączniku 4 (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki). Oświadczenia współautorów określające ich indywidualny wkład w powstanie prac wskazanych jako osiągnięcie naukowe stanowiące podstawę habilitacji zestawiono w Załączniku 5.*

### **4.3. Omówienie celu naukowego i osiągniętych wyników**

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

Poszukiwanie nowych leków jest działalnością bardzo kosztowną, z ograniczoną szansą na sukces. W szczególności badania *in vivo* nowych, potencjalnych leków są bardzo pracochłonne i kosztowne, co ogranicza ilościowo ich zastosowanie. Trudno jest prowadzić takie doświadczenia dla dużych grup potencjalnych leków. Dlatego ogromne znaczenie ma poszukiwanie możliwie mało kosztownych metod oceny niektórych właściwości związków chemicznych, ważnych dla ich potencjalnego działania biologicznego (np. biodostępności). Metody takie, zastosowane przed etapem badań *in vivo*, pozwalają na ograniczenie ilości syntezowanych kandydatów, a nawet ewentualne wykluczenie struktur, które nie wykazują oczekiwanych właściwości. Ich znaczenie widoczne jest też na etapie optymalizacji działania leków i przewidywania ewentualnych działań ubocznych, szczególnie

niepożądanych. Badania *in vivo*, nawet niewielkiej grupy przypadków, są jednak cenne dla wstępnych analiz porównawczych, w tworzeniu modeli analiz *in vitro*. Analiza *in vitro* może być stosowana do badania bardzo licznych przypadków, szczególnie jeśli zostanie potwierdzona za pomocą referencyjnej metody *in vivo*.

Istotna, z punktu widzenia oceny działania leku, jest informacja o jego zdolności do przekraczania barier biologicznych. Zjawiska transportu leków, wpływające na ich wartość terapeutyczną, prognozowane są lub badane różnymi metodami [1]:

- *in silico* (metody teoretyczne - obliczeniowe);
- metody analityczne (wykorzystujące zjawiska podziału między fazy, w mniejszym lub większym stopniu naśladujące warunki środowiska działania leku);
- metody oparte na liniach komórkowych;
- metody oparte na modelach tkankowych;
- metody badań *in vivo* na zwierzętach.

Metody analityczne (podziałowe), oparte na właściwościach fizykochemicznych związków chemicznych, umożliwiają najczęściej ocenę transportu biernego przez błony komórkowe, nie są natomiast najlepszymi narzędziami do modelowania zjawisk transportu aktywnego. Znaczenie transportu biernego w pokonywaniu przez cząsteczki barier biologicznych oraz łatwość wykonania eksperymentu tymi metodami, uzasadniają jednak ich stosowanie. Metody podziałowe pozwalają na ustalenie niektórych właściwości fizykochemicznych i prognozowanie zachowania związków chemicznych w warunkach fizjologicznych. Wśród metod podziałowych, stosowanych od wielu lat, do ustalania właściwości fizykochemicznych wpływających na transport bierny przez błony komórkowe należą: podział między fazę wodną i organiczną (najczęściej n-oktanol-woda), wodną i liposomy oraz fazę stacjonarną i ruchomą w odpowiednio zaprojektowanym eksperymencie chromatograficznym.

Publikacje, składające się na przedstawiony cykl prac, skupiają się na poszukiwaniu metod analitycznych prognozowania zdolności przenikania związków chemicznych do ośrodkowego układu nerwowego (OUN), przez barierę krew-mózg (*blood-brain barrier*, BBB) oraz na ustaleniu i wykorzystaniu w analizie właściwości fizykochemicznych, związanych z tym zjawiskiem.

Zaplanowany eksperyment realizowałam systematycznie, poprzez:

- analizę współczesnych trendów w modelowaniu właściwości fizykochemicznych i biodostępności związków chemicznych przy pomocy analizy chromatograficznej, prowadzonej w warunkach imitujących środowisko fizjologiczne (biochromatografia);
- analizę porównawczą istniejących i opracowanie nowych metod chromatograficznego wyznaczania lipofilowości substancji, ze szczególnym uwzględnieniem niektórych składników preparatów leczniczych i kosmetycznych;
- wybór i wstępne opracowanie grupy związków przeznaczonych do badań (zgromadzenie dostępnych wyników badań *in vivo* o zdolności przenikania BBB i ustalenie danych o właściwościach fizykochemicznych, wynikających ze struktury przestrzennej tych związków, po optymalizacji geometrycznej);
- opracowanie podstaw modelu analitycznego planowanego badania przenikania BBB (ustalenie warunków chromatografii – faza stacjonarna i skład fazy ruchomej) i zgromadzenie danych chromatograficznych;
- opracowanie modeli matematycznych prognozowania zdolności przenikania BBB metodami statystycznymi, z zastosowaniem danych chromatograficznych i fizykochemicznych;
- uzupełnienie istniejącej listy deskryptorów molekularnych, istotnych dla przenikania bariery krew-mózg, o nowe parametry *in vitro*;
- wykazanie przydatności zaproponowanej metodologii przewidywania zdolności przekraczania bariery krew-mózg na przykładzie: (i) związków o udowodnionej biodostępności do OUN (leki działające w ośrodkowym układzie nerwowym), (ii) związków nie przenikających BBB (składniki preparatów o działaniu naskórnym – związki promieniochronne i konserwanty) oraz (iii) dużej grupy analitów o zróżnicowanej budowie chemicznej i działaniu biologicznym.

#### **4.3.2. Omówienie wyników przedstawionych w publikacjach wchodzących w skład osiągnięcia naukowego**

Spośród technik chromatograficznych, stosowanych współcześnie do prognozowania niektórych właściwości fizykochemicznych i potencjalnego działania biologicznego substancji czynnych, na szczególną uwagę zasługuje chromatografia cienkowarstwowa. Technika ta charakteryzuje się stosunkowo niskim kosztem i łatwością wykonania, nie

wymaga stosowania skomplikowanej aparatury. Ogromna różnorodność zastosowań chromatografii cienkowarstwowej w badaniach chemicznych i biologicznych, olbrzymi potencjał tej techniki chromatograficznej w omawianym zakresie i możliwość niemal dowolnego kształtowania warunków eksperymentu chromatograficznego, w sposób jak najlepiej odpowiadający założonym celom, skłoniły mnie do wnikliwej analizy aktualnego stanu wiedzy w tej dziedzinie oraz perspektyw na przyszłość [P-1]. Jak wykazałam w omawianej pracy, zastosowania chromatografii cienkowarstwowej, w badaniach z obszaru farmakokinetyki (ADME – wchłanianie, dystrybucja, metabolizm, wydalanie), obejmują przede wszystkim parametry istotne dla wchłaniania i dystrybucji leku, a zwłaszcza lipofilowość i, w kilku przypadkach, stałą dysocjacji cząsteczki oraz jej rozpuszczalność w wodzie. Lipofilowość substancji oznacza powinowactwo cząsteczki do środowiska niepolarnego takiego, jak oleje, lipidy lub niepolarne rozpuszczalniki i stanowi ważny czynnik, determinujący bioaktywność. Wczesne prace, omawiające zależność między rozpuszczalnością substancji w tłuszczach i ich aktywnością narkotyczną pochodzą już z końca XIX stulecia [2]. Od tego czasu pojawiło się wiele doniesień na temat korelacji między lipofilowością substancji a ich aktywnością biologiczną (wg niektórych prac korelacja ta jest liniowa, a wg innych paraboliczna [3,4]). Zaproponowano również kilka sposobów wyrażania lipofilowości, mających na celu otrzymanie parametru jak najlepiej powiązanego z bioaktywnością cząsteczki. Bezspornie najbardziej powszechnie stosowanym deskryptorem lipofilowości jest współczynnik podziału oktanol-woda ( $\log P_{ow}$ ), mniej popularne, ale również użyteczne są współczynniki podziału między wodę a chloroform lub cykloheksan [5]. Niezależnie od sposobu wyrażania współczynnika podziału, jego pomiar metodą tradycyjną (wyrząsanie w układzie dwufazowym i oznaczanie zawartości substancji w obu fazach po osiągnięciu stanu równowagi) i sposobami z niej się wywodzącymi (np. [6]) w sposób oczywisty nastęrcza trudności, stąd duże zainteresowanie alternatywnymi metodami pomiaru, wśród których procedury oparte na chromatografii cienkowarstwowej zajmują bardzo ważne miejsce. U podstaw zastosowania metodyki chromatograficznej jako zastępnika metody wyrząsania legło podobieństwo między podziałem w układzie woda-oktanol i woda-faza stacjonarna w eksperymencie chromatograficznym. Do najczęściej stosowanych w pomiarach lipofilowości rodzajów chromatografii należy chromatografia w odwróconym układzie faz, na fazach stacjonarnych RP-18 lub RP-8, rzadziej stosuje się chromatografię na żelu krzemionkowym



impregnowanym olejami lub fazy stacjonarne CN, NH<sub>2</sub>, diol lub żel krzemionkowy bez impregnacji (chromatografia w normalnym układzie faz) [7,8].

Deskryptory lipofilowości, oparte na parametrach retencji w chromatografii planarnej w odwróconym układzie faz to przede wszystkim  $R_M = \log (1/R_f - 1)$  [9]. W przypadku chromatografii w odwróconym układzie faz, za najlepiej odzwierciedlające podział w układzie woda-oktanol uważa się warunki chromatograficzne: niepolarna faza stacjonarna (np. RP-18) – woda. Niestety, chromatografia na sorbentach lipofilowych z wodą jako eluentem jest wysoce niepraktyczna (długi czas eksperymentu i niskie wartości  $R_f$ ). Dlatego najczęściej stosowanym sposobem postępowania w celu otrzymania parametrów retencji dla czystej wody jest wykonanie eksperymentów chromatograficznych dla serii faz ruchomych, zawierających różne stężenia rozpuszczalników organicznych, mieszających się z wodą (np. metanol, acetonitryl, aceton, 1,4-dioksan, tetrahydrofuran) i ekstrapolacja otrzymanych wyników do zerowej zawartości modyfikatora organicznego w eluencie.

Ekstrapolacja do wartości  $R_M$  w czystej wodzie, ewentualnie z dodatkiem buforu ( $R_M^0$ ), dokonywana jest wg jednego z następujących równań:

$$R_M = R_M^0 - S\varphi \quad (1) \quad [10,11]$$

$$R_M = R_M^0 + b\varphi + c\varphi^2 \quad (2) \quad [12]$$

$$G(x_{\text{org}}) = \frac{x_{\text{org}}(1-x_{\text{org}})}{R_M^{-x_{\text{org}}} R_M^{\text{org}} - (1-x_{\text{org}}) R_M^0} = ax_{\text{org}} - b$$

(równanie Ościka) (3) [13]

Występujący w równaniu (1) współczynnik kierunkowy S sam w sobie stanowi użyteczny parametr, powiązany z powierzchnią hydrofobową molekuly. Inne przydatne deskryptory lipofilowości, wywodzące się z chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz to m.in.  $C_0 = R_M^0/S$  (ułamek objętościowy modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, dla którego stężenia analitu w fazie stacjonarnej i ruchomej są równe) oraz  $PC_1$  – pierwsza główna składowa uzyskana w wyniku analizy składowych głównych macierzy danych chromatograficznych ( $R_f$  lub  $R_M$ ), otrzymanych dla różnych zawartości modyfikatora organicznego w fazach ruchomych [14].

W pracy [P-1] przedstawiłam szczegółową dyskusję modeli chromatograficznych, stosowanych do ustalania niektórych właściwości fizykochemicznych analitów oraz związek

między tymi deskryptorami a modelowanymi efektami farmakokinetycznymi (ADMET) substancji takimi, jak:

- wiązalność z białkami osocza (*plasma-protein binding, PPB*),
- wchłanianie z układu pokarmowego (*human intestinal absorption, HIA*),
- objętość dystrybucji (*volume of distribution, V<sub>D</sub>*),
- przenikalność przez barierę krew-mózg (*BBBp*),
- zdolność do przekraczania bariery skórnej,
- oddziaływanie z receptorami,
- toksyczność.

Wykorzystanie lipofilowości w modelowaniu tych procesów, zachodzących w organizmie żywym, jest bardzo częste.

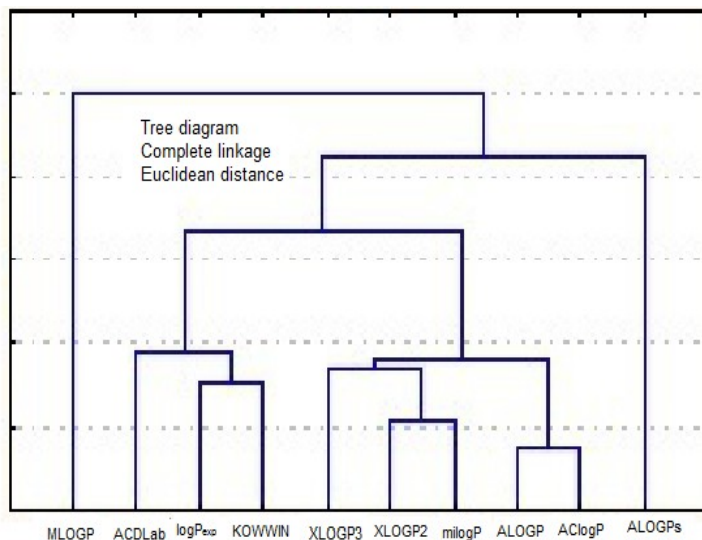
W planowanych badaniach nad zdolnością pokonywania bariery krew-mózg, założyłam wykorzystanie niektórych, obliczeniowych wskaźników tej formy biodostępności. Jeden z takich wskaźników ( $\log BB$  wyrażany jako  $BI = 0,139 + 0,152 \log P - 0,0148 PSA$  [15]) oparty jest na wartości współczynnika podziału  $\log P$  badanych przypadków. Ustalenie metody wiarygodnego pomiaru tego parametru, w jednakowy sposób dla wszystkich związków o zróżnicowanej strukturze i właściwościach, było ważne dla powodzenia moich planów.

Mając świadomość użyteczności chromatografii cienkowarstwowej, jako narzędzia umożliwiającego przewidywanie właściwości fizykochemicznych i zachowania się leku w organizmie pacjenta, postanowiłam dokonać porównania kilku parametrów chromatograficznych, jako deskryptorów lipofilowości, na przykładzie wybranych składników preparatów leczniczych i kosmetycznych (substancji promieniochronnych, biobójczych i witamin) [P-2]. Składniki preparatów kosmetycznych, наносzone miejscowo na skórę, mogą przekraczać barierę naskórka i inne bariery biologiczne w organizmie użytkownika; z kolei uwalniane w dużych ilościach do środowiska naturalnego ulegają w ekosystemach wodnych licznym przemianom, tworząc potencjalnie toksyczne produkty [16, 17]. Procesy transportu tych substancji przez błony biologiczne polegają, w znacznym uproszczeniu, na ich kolejnych podziałach między fazy wodne i lipidowe, są zatem w dużym stopniu zależne od lipofilowości. Spośród substancji, badanych w mojej pracy, oceny lipofilowości technikami chromatograficznymi (TLC i HPLC) dokonano wcześniej tylko dla witamin rozpuszczalnych w tłuszczach oraz konserwantów z grupy parabenów, nie

podejmowano natomiast takich działań dla substancji promieniochronnych [18-21]. Badania objęły 22 surowce kosmetyczne o różnej lipofilowości [P-2], dla dziewięciu z nich znane były wartości eksperymentalne  $\log P_{exp}$ , mierzone metodą wytrząsania.

W pierwszym etapie prac uzyskano teoretyczne wartości  $\log P$ , posługując się różnymi metodami obliczeniowymi: ALOGPs, AClogP, milogP, ALOGP, MLOGP, KOWWIN, XLOGP2, XLOGP3 oraz ACD/Lab [22]. Wyniki obliczeń przy pomocy tych metod różniły się dość znacznie. Aby wybrać metodę obliczania  $\log P$  *in silico*, dającą dla badanej grupy przypadków wyniki możliwie dobrze odzwierciedlające wartości  $\log P_{exp}$ , posłużono się analizą skupień [23] (Rys. 1).

Rys. 1. Struktura drzewa hierarchicznego dla 10 metod wyznaczania  $\log P$



Analizując otrzymane wyniki obliczeń  $\log P$  dziewięcioma wyżej wymienionymi metodami i wartości eksperymentalne  $\log P_{exp}$  (Rys. 1) stwierdzono, że spośród zastosowanych metod obliczeniowych wartości najbliższe eksperymentalnym dawały obliczenia za pomocą programu ACD/Lab oraz metodą KOWWIN i te właśnie algorytmy obliczeniowe zastosowano w większości dalszych rozważań.

W dalszej części pracy zmierzono współczynniki retencji  $R_f$  oraz obliczono  $R_M$  dla 22 badanych substancji, stosując fazę stacjonarną RP-18 oraz dwuskładnikowe mieszaniny wody i następujących modyfikatorów organicznych: metanol, acetonitryl, dimetyloformamid, 1,4-dioksan, tetrahydrofuran, aceton (zawartości modyfikatora organicznego  $\phi$  wynosiły 40 do 90% v/v). Otrzymane wartości  $R_M$  dla poszczególnych modyfikatorów ekstrapolowano do

$\varphi=0$ . Zaobserwowano, że spośród 22 badanych związków, niektóre (o znacznej lipofilowości,  $\log P > 8$ ) nie mogą być badane chromatograficznie na sorbencie RP-18, o ile zastosowano eluenty, zawierające metanol, dimetyloformamid lub acetonitryl (dla wszystkich lub znacznej większości faz ruchomych, zawierających te rozpuszczalniki, dla substancji tych otrzymano  $R_f \approx 0$ , co uniemożliwiło wykonanie ekstrapolacji). Jednocześnie fazy ruchome oparte na dioksanie, tetrahydrofuranie lub acetonie (rzadko stosowane w dotychczasowej praktyce pomiarów chromatograficznych lipofilowości) nadają się do badania substancji o wysokich wartościach  $\log P$ , również tych, których współczynnik podziału woda/oktanol nie może być mierzony metodą wytrząsania. Analiza korelacji wartości obliczonych  $\log P$  z parametrami chromatograficznymi ( $R_M^0$ ) wykazała, że w szczególności aceton i dioksan dają wyniki o jakości porównywalnej z wynikami dla metanolu czy acetonitrylu, ale ich zastosowanie nie jest ograniczone do substancji o niskiej do średniej lipofilowości.

Parametr  $R_M^0$  jako chromatograficzny deskryptor lipofilowości, choć stosunkowo dobrze odzwierciedla zjawisko podziału substancji w układzie woda-oktanol i jest chętnie stosowany, ma także pewne wady – wymaga wykonania dość dużej liczby eksperymentów chromatograficznych, a ponadto jego wartość różni się znacząco w zależności od zastosowanego modyfikatora organicznego, a nawet zakresu stężeń  $\varphi$ , zastosowanych do ekstrapolacji [24]. W celu wyeliminowania wspomnianych niedogodności, dalsze etapy prac przebiegały jednocześnie w dwóch kierunkach. Po pierwsze, posługując się metodą składowych głównych [25] uzyskano wartości PC1 dla poszczególnych modyfikatorów organicznych, oddzielnie dla surowych danych chromatograficznych ( $R_f$ ) oraz dla  $R_M$ , uwzględniając wyłącznie 16 mniej lipofilowych związków (wartości  $R_f > 0$  dla przynajmniej 5 najwyższych  $\varphi$ ). Stwierdzono, że wartości PC1 pozostają w liniowej zależności od obliczonego  $\log P$  ( $0,65 < R^2 < 0,90$ ;  $n = 16$ ), zaś współczynniki korelacji zależą zarówno od zastosowanego algorytmu obliczeniowego (najwyższe są dla KOWWIN i MlogP), jak i od modyfikatora organicznego (najgorsze wyniki uzyskano dla THF, najlepsze, wbrew wszelkim oczekiwaniom, dla DMF). Nieprzydatność THF oraz skuteczność DMF (i, w mniejszym stopniu, metanolu) jako składnika faz ruchomych w badaniach lipofilowości omawianą metodą potwierdzono, analizując korelacje między PC1 (obliczonego zarówno dla  $R_f$ , jak i  $R_M$ ) a  $\log P_{exp}$  ( $n = 9$ ).

Równoległe z zastosowaniem metody składowych głównych, która nie okazała się szczególnie korzystną alternatywą, podjęto próbę chromatograficznej oceny lipofilowości za

pomocą wartości  $R_M$  dla pojedynczych eluentów (bez ekstrapolacji do  $\varphi = 0$ ). Analizując korelacje liniowe  $\log P_{exp} - R_M$  ( $n = 9$ ) dla 24 faz ruchomych opisanych powyżej przyjęto warunki minimalne, jakim powinna odpowiadać akceptowalna faza ruchoma:  $R^2 > 0,90$  oraz współczynnik kierunkowy  $> 0,30$ ; fazy ruchome, dla których jakkolwiek z 9 badanych związków o znanym  $\log P_{exp}$  dawał  $R_f = 0$ , odrzucono. Stosując tak zdefiniowane kryteria uznano za szczególnie korzystne eluenty metanol 70% v/v, DMF 70% v/v oraz dioksan 60% v/v. Przydatność tych faz ruchomych potwierdzono korelacjami  $\log P_{ACD_{Lab}} - R_M$  dla 16 badanych związków o mniejszej lipofilowości ( $\log P_{ACD_{Lab}} < 10$ ; w przypadku substancji o wyższej lipofilowości  $R_f = 0$ ).

Możliwości wyznaczania lipofilowości metodami chromatograficznymi ma, jak wykazało powyższe doświadczenie, znaczne ograniczenia. Pracochłonne doświadczenie nie jest również uniwersalne w stosunku do zróżnicowanych strukturalnie analitów. Doświadczenia te wykazały równocześnie zbieżność wyników zastosowania metod obliczeniowych współczynnika podziału z wartością  $\log P_{exp}$ , wyznaczonego dla tych samych związków. Dzięki temu, decyzja o metodzie wyznaczania lipofilowości, wśród wielu innych parametrów fizykochemicznych, dla dużej liczby przypadków (ostatecznie powyżej 150 związków), o jak najbardziej zróżnicowanej strukturze, zapadła na korzyść metod obliczeniowych. Już na etapie planowania badań nad modelowaniem przenikania BBB oczywiste było, że nawet uproszczony model matematyczny nie będzie oparty na jednym czynniku, z uwagi na złożony charakter zjawiska. Inne parametry fizykochemiczne mogły być obliczone na podstawie struktury przestrzennej związków po optymalizacji geometrycznej, przy pomocy dostępnych mi metod HyprChem i ACD/Lab. Lipofilowość badanych przypadków może być więc obliczona tymi samymi metodami.

Bariera krew-mózg (*blood-brain barrier*, BBB) jest główną fizyczną i enzymatyczną barierą, oddzielającą tkanki mózgu od krwi [26]. Zdolność do jej przekraczania jest ważnym warunkiem działania leków z celem biologicznym w OUN, z drugiej zaś strony wiele substancji, z założenia działających poza ośrodkowym układem nerwowym wykazuje działania uboczne ze względu na niepożądane przenikanie przez BBB [27, 28]. Zdolność substancji do przekraczania tej bariery można badać, posługując się metodami *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo* oraz *in silico*, przy czym metody każdej z tych grup mają zarówno zalety, jak i wady [28, 29]. Znaczny koszt i pracochłonność eksperymentów *in vivo* oraz konieczność przeprowadzania badań na zwierzętach doprowadziły do rozwoju innych metod,

w szczególności *in vitro* na linach komórkowych. Jeszcze łatwiejsze i tańsze pod względem eksperymentalnym są metody *in vitro* nie bazujące na hodowlach komórkowych, a zwłaszcza wykorzystujące techniki laboratoryjne, np. chromatograficzne na fazach stacjonarnych, możliwie wiernie naśladujących błony biologiczne [30], oraz metody czysto teoretyczne *in silico* [31, 32]. Wspólnym celem większości zaproponowanych metod oceny przenikania substancji czynnych przez barierę krew-mózg jest przewidywanie ilościowego wskaźnika tego przenikania –  $\log BB$  (gdzie  $BB$  - stosunek stężeń substancji w układzie krew-mózg w stanie równowagi) [33] i ewentualna klasyfikacja jakościowa do jednej z dwóch grup aktywności: OUN+ (aktywny w ośrodkowym układzie nerwowym) lub OUN- (nieaktywny w ośrodkowym układzie nerwowym) [34]. Definiowanie substancji jako OUN+ lub OUN- ma pewne zalety, ponieważ umożliwia porównanie cząsteczek, dla których dostępne są także inne, niż wspomniana wartość  $\log BB$ , miary przenikalności przez BBB. Istnieje jednak także wada takiej klasyfikacji. Przypisując substancję do grupy OUN+ mamy pewność, że substancja ta w istocie przenika barierę krew-mózg, natomiast w przypadku odwrotnym (OUN-) istnieje możliwość, że mimo zdolności do przekraczania BBB substancja nie będzie wykazywać działania w ośrodkowym układzie nerwowym, na przykład z powodu szybkiego metabolizmu lub usuwania z układu.

Zdolność do przechodzenia przez barierę krew-mózg, choć w znacznym stopniu związana z lipofilowością substancji [3, 4, 35], w rzeczywistości zależy od szeregu właściwości fizykochemicznych związku, a jej przewidywanie wyłącznie na podstawie lipofilowości w układzie woda-oktanol może prowadzić do błędów (w szczególności do mylnego klasyfikowania leków jako przekraczających tą barierę, OUN+) [36]. W świetle opublikowanych dotychczas danych, substancje o znacznej zdolności do przekraczania BBB charakteryzują się następującymi właściwościami:

- Liczba atomów (N+O)  $\leq 5$
- $\log P - (N+O) > 0$
- Pole powierzchni polarnej (*Polar Surface Area*, PSA) poniżej pewnej granicy
- Masa cząsteczkowa  $M_w < 450$
- Stosunkowo wysoka lipofilowość
- Obecność elektronów ulegających polaryzacji, np. wiązania sprzężone lub struktury aromatyczne.
- Molekuły o kształcie raczej sferycznym, niż podłużnym

- Właściwości raczej zasadowe, niż kwasowe.

W uproszczeniu, cząsteczki łatwo przechodzące przez BBB są raczej mniejsze, bardziej lipofilowe, bardziej sferyczne, mają mniej donorów i akceptorów wiązań wodorowych (N+O) i mniej formalnych ładunków, niż te, które bariery tej nie przekraczają [15, 37-41].

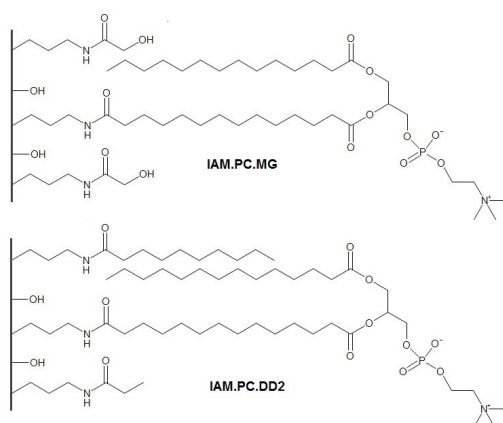
Mimo ogromnego zainteresowania modelowaniem zdolności substancji do wnikania do mózgu, dostępne zbiory danych z tego zakresu są stosunkowo nieliczne. Opublikowane prace dotyczą zazwyczaj ograniczonej liczby przypadków, wybranych spośród ok. 300 substancji, dla których dostępne są dane ilościowe  $\log BB$  *in vivo*, pochodzące z różnych źródeł i otrzymane różnymi technikami. Klasyfikacja jakościowa, obejmująca substancje, których wskaźniki aktywności w OUN pozyskano różnymi metodami obejmuje znacznie większą grupę przypadków (ponad 1500, a wg niektórych autorów nawet ok. 14000 związków) [42, 43].

Badania *in vivo*, nawet niewielkiej grupy przypadków, są bardzo cenne dla wstępnych analiz porównawczych w tworzeniu modeli przenikalności *in vitro*. Analiza *in vitro*, nie poddająca się ograniczeniom czasowym i ekonomicznym charakterystycznym dla badań *in vivo*, może być stosowana do badania bardzo licznych przypadków. Jeśli wyniki modelowania *in vitro* zostaną potwierdzone za pomocą referencyjnej metody *in vivo*, metoda *in vitro* pozwoli na wstępny wybór przypadków o potencjalnej aktywności biologicznej, lub na ocenę możliwych działań ubocznych badanej substancji czynnej.

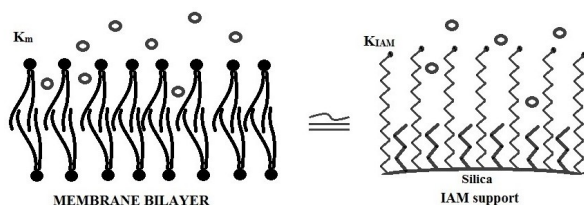
Zdolność przenikania bariery krew-mózg może być między innymi odzwierciedlona przy pomocy danych z analizy chromatograficznej kolumnowej i cienkowarstwowej (współczynnika retencji  $k$ ,  $\log k$ ,  $R_f$ ,  $R_M$ , czasu retencji  $t_k$ , objętości retencji  $V_k$ ). Dane te uzyskuje się przy pomocy chromatografii na przykład w odwróconym układzie faz (RP-18, RP-8, na fazie stacjonarnej z modyfikacją amidową) oraz stosując chromatografię z fazami ruchomymi micelarnymi, mikroemulsyjnymi, a nawet chromatografię wysalania (*salting-out chromatography*) [44-52]. Technika cieczonej chromatografii kolumnowej, szczególnie dobrze przystosowaną do przewidywania zdolności substancji do przekraczania barier biologicznych, jest chromatografia na fazach stacjonarnych, zawierających fosfolipidy, kowalencyjnie przyłączone na powierzchni żelu krzemionkowego, modyfikowanego grupami aminopropylowymi – (*Immobilised Artificial Membrane – IAM*) (Rys. 2) [51-62]. Tak zaprojektowane fazy stacjonarne stanowią dość wierny odpowiednik strukturalny

fosfolipidowej błony komórkowej (Rys. 3). Zastosowania chromatografii IAM do przewidywania właściwości fizykochemicznych i modelowania procesów wchłaniania i dystrybucji leków opisałam, analizując jednocześnie nowe trendy i perspektywy w tej dziedzinie, w publikacji [P-3].

Rys. 2. Struktura typowych faz stacjonarnych IAM



Rys. 3. Faza IAM jako substytut błony biologicznej



Chromatografia kolumnowa IAM (na dostępnych handlowo fazach stacjonarnych, zawierających fosfolipidy związane kowalencyjnie, oraz – w mniejszym stopniu – na fazach RP-18 lub RP-8 impregnowanych fosfolipidami) stosowana jest szeroko do oceny właściwości lipofilowych i hydrofobowych cząsteczki. Podobnie, jak w przypadku omawianej wcześniej chromatografii cienkowarstwowej w odwróconym układzie faz, w celu uzyskania największego podobieństwa między warunkami eksperymentu chromatograficznego a interakcjami analit-błona biologiczna *in vivo* należałoby posługiwać się danymi chromatograficznymi uzyskanymi dla fazy ruchomej całkowicie wodnej o fizjologicznym pH ( $k_w$ ) lub, w ostateczności, fazy wodnej o niewielkim dodatku modyfikatora organicznego (np. 10%) [63]. Jednak w wielu sytuacjach, gdy czasy retencji substancji z takimi fazami ruchomymi są zdecydowanie zbyt długie, stosuje się większe,



zmienne dodatki modyfikatorów organicznych i uzyskuje wartość  $k_w$  na drodze ekstrapolacji [10, 11] (równanie (4)), ewentualnie stosuje się technikę chromatografii z gradientem składu fazy ruchomej (równanie (5)).

$$\log k = S\varphi + \log k_w \quad (4)$$

$$\text{CHI} = A t_R + B \quad (5) \quad [64]$$

Zarówno  $\log k_w$ , otrzymany za pomocą równania (4),  $\varphi_0$  (zawartość modyfikatora organicznego w fazie ruchomej, przy której stężenia analitu w fazie ruchomej i stacjonarnej są równe, równanie (4) [65]) jak i chromatograficzny indeks hydrofobowości CHI (równanie (5)) dają użyteczne skale lipofilowości, alternatywne w stosunku do  $\log P_{o/w}$  [66].

Parametry chromatograficzne, uzyskiwane w chromatografii IAM, powiązane są z innymi miarami biodostępności *in vitro* – współczynnikiem podziału woda - liposomy [67, 68] oraz dla linii komórkowych Caco-2 [69, 70]. Stanowią także użyteczne dane, pozwalające, oprócz zdolności do przenikania bariery krew-mózg prognozować właściwości biologiczne substancji takie, jak:

- wchłanianie z przewodu pokarmowego [69-77]
- objętość dystrybucji [78, 79]
- zdolność do wiązania z białkami [80, 86]
- zdolność do przekraczania bariery skórnej [82-85]
- toksyczność, w szczególności w stosunku do organizmów wodnych [81, 84]

Chromatografia na współcześnie stosowanych fazach stacjonarnych IAM ma wiele zalet, ale nie jest oczywiście w stanie odzwierciedlić wszystkich zjawisk transportu i oddziaływań cząsteczki z błonami komórkowymi. Biorąc pod uwagę wzrastające znaczenie modeli opartych na danych chromatograficznych w połączeniu z obliczanymi deskryptorami molekularnymi można uznać, że znaczenie tego rodzaju chromatografii w badaniach ADMET będzie wzrastać [87, 88]. Można także spodziewać się, że prognozowanie przenikalności substancji przez barierę krew-mózg z pewnością stanowić będzie bardzo ważny obszar jej zastosowania [P-3].

W prowadzonych współcześnie badaniach zdolności przenikania BBB bardzo rozpowszechnione jest podejście obliczeniowe. Znane są różne sposoby ustalania biodostępności – zasady praktyczne wynikające z doświadczenia („rules of thumb”); metoda klasyfikacji; metody oparte na ustalaniu ilościowej zależności pomiędzy strukturą a działaniem badanych przypadków (QSAR); wspomniane już podejście praktyczne, oparte

na wskazaniu korzystnych dla przenikania przez BBB wartości parametrów fizykochemicznych [15, 37-41, 89-91].

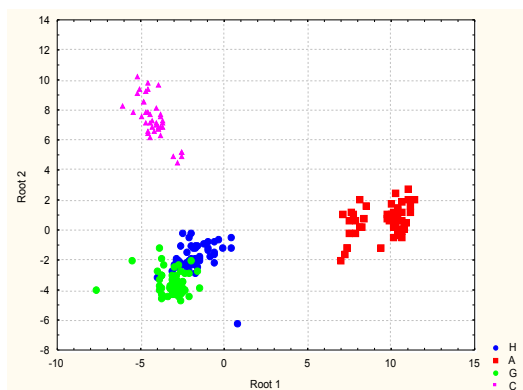
Związki o szkielecie pochodnych benzodiazepiny (BDZ) stanowią bardzo liczną grupę substancji aktywnych biologicznie. Ogromne zainteresowanie budzi wielkie zróżnicowanie działania farmakologicznego tych pochodnych. Podstawowym kierunkiem ich działania jest efekt anksjolityczny pochodnych 1,4-benzodiazepiny, związany z receptorem benzodiazepinowym ( $GABA_A$ ). Doniesienia bibliograficzne udowadniają jednak kilkanaście innych kierunków działania pochodnych o tym szkielecie podstawowym [P-4]. W badaniach, prowadzonych w Zakładzie Chemii Analitycznej UM w Łodzi i będących podstawą pracy doktorskiej dr Piotra Włodno założono, że zróżnicowanie działania BDZ może wynikać z ich biodostępności, szczególnie w stosunku do OUN. Taka biodostępność związana jest ze zdolnością przenikania bariery krew-mózg. Porównawcza analiza zależności działania ponad 200 pochodnych BDZ, od ich struktury i właściwości fizykochemicznych, została przeprowadzona w oparciu o zasady praktyczne i ustaloną charakterystykę przenikania bariery krew-mózg. W rozważaniach przyjęto również dwie miary obliczeniowe zdolności tego przenikania –  $\log BB$  ( $B1$  i  $B2$ ) [P-4], obliczane z zastosowaniem różnych deskryptorów molekularnych wg wzorów (6) i (7):

$$B1 (\log BB = 0,139 + 0,152 \log P - 0,0148 PSA) \quad (6) \quad [15]$$

$$B2 (\log BB = 0,547 - 0,016 PSA) \quad (7) \quad [92]$$

Wartość prognostyczna przenikania BBB –  $B1$  i  $B2$  – została potwierdzona analizą wieloczynnikowej regresji liniowej (Multiple Linear Regression – MLR), co pozwoliło na dalsze badania z zastosowaniem tych deskryptorów. Parametry fizykochemiczne badanych pochodnych BDZ, które odegrały ważną rolę w analizie QSAR, zostały następnie zastosowane w analizie funkcji dyskryminacyjnej (*Discriminant Function Analysis* – DFA). Funkcje dyskryminacyjne całkowicie rozdzieliły cztery grupy pochodnych BDZ: A – związki antyarytmiczne, H – nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy HIV-1, G – związki z powinowactwem do receptora GABA i C – antagoniści cholecystokininy, których działanie powiązane jest z biodostępnością w OUN. Wśród 211 związków odnotowano tylko 5 błędnie przyporządkowanych do, ustalonych *a priori*, grup działania [P-4] (Rys. 4).

Rys. 4. Pochodne BDZ o różnych kierunkach aktywności biologicznej



Opisany powyżej temat został później, z moim udziałem, uzupełniony, dopracowany pod względem obliczeniowym (poszerzona walidacja) i opublikowany w postaci pracy [P-4]. Badania te były dla mnie inspiracją i początkiem dalszych doświadczeń nad stworzeniem uniwersalnego modelu analitycznego, pomocnego w przewidywaniu zdolności przenikania związków chemicznych przez barierę krew-mózg. Uzyskany tu bardzo dobry wynik analizy QSAR i SAR dotyczył znaczącej liczby (211) przypadków badanych i był potwierdzony grupą zewnętrzną 38 przypadków walidujących. Wszystkie poddane analizie związki należały jednak do grupy pochodnych BDZ. Zostały też zgromadzone w celu wyjaśnienia znacznego zróżnicowania działania biologicznego związków o podobnej budowie. Powstałe modele matematyczne nie mogły być więc uznane za uniwersalne narzędzie przewidywania zdolności przenikania BBB przez związki o innej budowie. Analiza związków chemicznych o znacznym zróżnicowaniu strukturalnym i wykazujących różne działanie biologiczne lub jego brak, wydawała mi się bardzo interesująca. Pragnęłam również zwiększyć wiarygodność łatwych do ustalenia wskaźników przenikania BBB – obliczeniowych  $\log BB$  i potwierdzić wartość analizy przez użycie wyników metody referencyjnej – badań *in vivo*, pozyskanych z prac innych autorów.

Dla konstruowania uniwersalnych metod badania substancji czynnych, konieczne wydaje się też uwzględnienie ich zachowania w, choćby częściowo, odtworzonych warunkach fizjologicznych. Takie możliwości daje zastosowanie analizy chromatograficznej z użyciem fazy ruchomej, tworzącej fizjologiczne (krew) środowisko o pH 7,4 i fazy stacjonarnej, umożliwiającej badanie związków w jak najszerszym zakresie struktur i właściwości. Metody uniwersalne powinny być szybkie, nawet w przypadku badania licznych związków, tanie, dostępne i proste w realizacji. Takie warunki spełnia chromatografia cienkowarstwowa. Najczęściej używaną, dostępną i skuteczną w szerokim

zakresie zmienności strukturalnej analitów, jest stosowana przeze mnie wcześniej w badaniach nad lipofilowością [P-2] chromatografia z odwróconym układem faz – RP-18 TLC. Stabilny skład fazy ruchomej pozwala na porównanie zachowania różnych związków w tych samych warunkach. Potwierdzenie jakości uzyskiwanych chromatogramów, precyzyjne porównanie chromatografowanych związków oraz łatwą archiwizację wyników zapewnia zastosowanie fotodensytometrii.

Na tej podstawie zaplanowałam i przeprowadziłam badania służące ustaleniu warunków doświadczenia chromatograficznego RP-18 TLC, które pozwoliłyby zwiększyć wiarygodność analizy QSAR w przewidywaniu biodostępności leków oraz innych związków chemicznych do ośrodkowego układu nerwowego.

Początkowo przeprowadziłam doświadczenie [P-5], dotyczące badania skuteczności metody, opartej na modelu chromatograficznym RP-18 TLC, w stosunku do grupy leków aktywnych w OUN. Zastosowano mieszaninę acetonitryl-bufor fosforanowy (pH 7,4) 70:30 (v/v), jako fazę ruchomą. Analiza densytometryczna była prowadzona przy pomocy wiązki promieniowania UV o długościach fal z zakresu 200-300 nm. W doświadczeniu zbadano 34 leki o zróżnicowanej budowie chemicznej. Zgromadzono ilościowe dane literaturowe o zdolności przenikania BBB, pochodzące z badań *in vivo*, opisanych przez innych autorów [93]. Dane ustalone w cytowanym doświadczeniu *in vivo* (jako *BBvivo*) zastosowano dla 24 badanych przypadków, jako wyniki metody referencyjnej. Zgromadzono również dane, o charakterze dychotomicznym – OUN+ i OUN-, dla wszystkich 34 przypadków. Dane te pochodziły z bazy danych o lekach DrugBank [94]. Grupa 10 leków, dla których nie przedstawiono wartości *BBvivo*, była przewidziana do badania wiarygodności wskaźników obliczeniowych  $\log BB - B1$  i  $B2$  oraz jako grupa zewnętrzna do walidacji wyników DFA, przeprowadzonej w grupie 24 związków zbadanych *in vivo*. Związki z grupy walidacyjnej zostały dobrane tak, aby 5 z nich reprezentowało cechę OUN- i 5 cechę OUN+. Wszystkie zastosowane w doświadczeniu związki zostały opisane obliczonymi, po optymalizacji geometrycznej, parametrami fizykochemicznymi. Użyto programów obliczeniowych HyperChem [95] i ACD/Lab [96]. Uzyskane dane poddano analizie chemometrycznej. W pierwszej kolejności wykonano analizę wielorakiej regresji liniowej – (*Multiple Linear Regression*, MLR), w celu ustalenia korelacji trzech wskaźników przenikania BBB i danych chromatograficznych dla 24 związków. Zmienne zależne: *BBvivo*,  $B1$  i  $B2$  wykazały istotną statystycznie korelację z danymi chromatograficznymi (odpowiednio:  $R = 0,66$ ;  $R = 0,65$  i  $R$

= 0,91). Wskaźnik  $B2$  był więc najsilniej skorelowany ze zmiennymi RP-18 TLC. Ustalono również powiązanie pomiędzy  $BBvivo$  i parametrami obliczeniowymi na poziomie  $R = 0,48$  dla  $BBvivo/B1$  i  $R = 0,72$  dla  $BBvivo/B2$ . Na tej podstawie zdecydowano o zastosowaniu w następnych analizach tylko zmiennej  $B2$ . Analiza MLR, wykonana metodą krokową postępującą, z udziałem zmiennych fizykochemicznych, wprowadziła do modelu działania  $BBvivo$  (24 zw.) kolejno:  $\log D$  – współczynnik dystrybucji i  $B2$  ( $R = 0,83$ ). Następnie wykonano MLR z udziałem wszystkich zmiennych fizykochemicznych i chromatograficznych. W modelu pojawiły się kolejno zmienne:  $B2$ , współczynnik zatrzymania –  $R_f$ , współczynnik zatrzymania modyfikowany polarnym polem powierzchni analitu –  $R_f/PSA$  i  $\log D$ . Uzyskano korelację na poziomie  $R = 0,92$ . Dla tej samej grupy związków wykonano analogicznie analizę MLR ze zmienną zależną  $B2$ . Spośród zmiennych fizykochemicznych analiza krokowa wprowadziła kolejno: liczbę akceptorów wiązań wodorowych ( $HA$ ), liczbę donorów wiązań wodorowych ( $HD$ ) oraz moment dipolowy ( $DM$ ). Uzyskano współczynnik korelacji  $R = 0,93$ . Analiza krokowa MLR ze wszystkich zmiennych wprowadziła kolejno:  $HA$ ,  $HD$ ,  $DM$ ,  $R_f/PSA$  i  $R_f$ . Uzyskano współczynnik korelacji  $R = 0,96$ . Wszystkie uzyskane modele regresji były pomyślnie walidowane metodami walidacji krzyżowej LOO (*leave-one-out*) i LMO (*leave-many-out*) [P-5]. Jak widać, zmienne niezależne o charakterze doświadczalnym i obliczeniowym (dane fizykochemiczne) wzajemnie poprawiają wynik analizy.

Możliwość stosowania obliczeniowego parametru  $B2$ , zamiast trudnego do ustalenia  $BBvivo$ , badano w grupie wszystkich 34 przypadków. Analiza MLR wykazała korelację zmiennej zależnej  $B2$  z danymi chromatograficznymi na, wyższym niż dla  $n = 24$ , poziomie  $R = 0,83$ . W połączeniu z właściwościami fizykochemicznymi, powstały model z udziałem:  $HA$ ,  $HD$  i  $R_f/PSA$ , wyjaśnia 95% wariacji całkowitej  $B2$  ( $R = 0,98$ ).

Należy podkreślić, że wszystkie zmienne o charakterze fizykochemicznym, które znalazły się w składzie modeli matematycznych MLR, dla zmiennych zależnych  $BBvivo$  i  $B2$ , należą do grupy tradycyjnie związanej z przenikaniem BBB –  $\log D$ ,  $HD$ ,  $HA$  oraz  $DM$ , co potwierdza wyniki poprzedniego badania [P-4].

Dla wszystkich zmiennych, wskazanych modelami MLR, przeprowadzono analizę funkcji dyskryminacyjnej DFA, metodą krokową postępującą (zmienna kodująca – 0 dla OUN- oraz 1 dla OUN+). Pierwszą zmienną dyskryminującą wprowadzoną do modelu był  $\log BB - B2$ , drugą  $R_f/PSA$  i trzecią  $R_f$ . Macierz klasyfikacji powstałych modeli wykazała

100% dyskryminację badanych przypadków, na ustalone *a priori* grupy OUN+ i OUN-. W celu potwierdzenia wartości tej analizy, wprowadzono dodatkowo walidację przy pomocy zewnętrznej grupy testowej (odpowiednio 5 przypadków OUN- i 5 OUN+). Używając ustalonych funkcji klasyfikacyjnych, obliczono dla tych przypadków odpowiednie wartości. Większa wartość wyliczona dla funkcji OUN- lub OUN+ wskazuje przynależność do grupy zdefiniowanej tą funkcją. Wszystkie związki grupy testowej zostały przypisane do właściwych grup OUN+/-.

Zmienne niezależne, wyłonione w analizie MLR, zastosowano także w badaniu DFA dla 34 przypadków. Zmiennymi dyskryminującymi były, jak poprzednio,  $B2$  i  $R_f/PSA$ . Macierz klasyfikacji uzyskana w tej analizie przedstawia całkowity odsetek prawidłowo sklasyfikowanych przypadków równy 97,1%. Wykonano walidację krzyżową tego modelu, której macierz wykazuje wyższe prawdopodobieństwo właściwej klasyfikacji (100%), niż prawdopodobieństwo *a posteriori*.

Dla podkreślenia wartości diagnostycznej i różnicy wartości parametrów decydujących o zdolności pokonywania BBB, przeprowadzono też analizę skupień (*Cluster Analysis* – CA) metodą k-średnich. Średnie najważniejszych deskryptorów:  $HD$ ,  $HA$ ,  $R_f$ ,  $R_f/PSA$  i  $B2$  wyraźnie różnią się dla grup OUN+ i OUN- (wartości przypisane odpowiednio: 1 i 0). Jedynie parametr  $DM$ , który nie znalazł się ostatecznie wśród zmiennych dyskryminujących DFA (analiza metodą krokową), wykazuje tę samą wartość średniej dla obu grup [P-5].

Przedstawione powyżej doświadczenia [P-5] wykazały ścisły związek danych chromatograficznych RP-18 TLC (w ustalonych warunkach, definiujących model analityczny) z biodostępnością leku w OUN i potwierdziły wartość obliczeniowych parametrów  $\log BB - B1$  oraz  $B2$ . W połączeniu z obserwacją danych fizykochemicznych i analizą chemometryczną ustalono modele matematyczne, użyteczne w przewidywaniu zdolności przekraczania bariery krew-mózg. Przenikanie BBB może być prognozowane również bez dostępu do wyników badań *in vivo* ( $BBvivo$ ). Wykorzystywane analizy: MLR i DFA wyłoniły grupę parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych, ważnych dla biodostępności leków do OUN. Zastosowanie CA podkreśliło zróżnicowanie ich średnich wartości w grupach OUN+ i OUN-. Badania te dotyczyły leków, w większości aktywnych w OUN [P-5].

Prawdziwie skuteczny model analityczny powinien znaleźć zastosowanie również w badaniu grup związków o całkowicie innych właściwościach, na przykład w celu potwierdzenia braku ich dostępu do OUN. Do substancji, których dostęp do OUN jest niepożądany, należą m.in. składniki preparatów naskórných, które wykazywać powinny działanie miejscowe w naskórku lub na powierzchni włosa. Niestety jednak, niektóre ze stosowanych współcześnie np. surowców kosmetycznych nie tylko przekraczają barierę skóry, ale ulegają akumulacji w tkankach lub podlegają różnorodnym procesom metabolicznym. Do związków takich należą m.in. substancje promieniochronne, stosowane we współczesnych formułacjach kosmetycznych. Skutki uboczne ich stosowania mogą przejawiać się na przykład w działaniu endokrynnym u ssaków. Dość szeroko badano także ich zdolność do wpływania na procesy reprodukcyjne ryb oraz wymieranie raf koralowych. Stwierdzono również, że substancje promieniochronne mogą ulegać przemianom chemicznym w wodzie chlorowanej, dając chlorowcopochodne o większym stopniu szkodliwości, niż struktury macierzyste [16, 17, 97-112]. W literaturze nie odnotowano natomiast danych na temat możliwości (ani też braku możliwości) przekraczania przez nie bariery krew-mózg w przypadku, gdy po przeniknięciu bariery skórnej trafią do krwioobiegu. Biorąc pod uwagę lipofilowość niektórych często używanych filtrów UV i konserwantów [P-2], sprzyjającą przekraczaniu barier biologicznych, niebezpieczeństwo takie wcale nie jest wykluczone. Uznałam zatem za celowe zbadanie wybranych substancji promieniochronnych i konserwantów pod kątem ich biodostępności w OUN, przy pomocy opracowanych wcześniej modeli matematycznych [P-5] a wyniki badań przedstawiłam w pracy [P-6].

Przeprowadzono wszystkie doświadczenia chromatograficzne oraz obliczenia *in silico* z zachowaniem warunków ustalonych wcześniej i z zastosowaniem wskazanych parametrów. Zgromadzono w tym celu próbki 18 związków chemicznych funkcjonujących w recepturze kosmetycznej i farmaceutycznej, jako substancje promieniochronne i konserwujące [P-6]. Związki te stanowiły podstawową grupę badawczą i mogły być poddane analizie chromatograficznej (RP-18 TLC) z zastosowaniem ustalonego modelu analitycznego przenikania BBB [P-5]. Dodatkowo wprowadzono do analizy 9 związków chemicznych o znanej strukturze. Posłużyły one jako grupa przypadków badanych funkcjami klasyfikacyjnymi, opisanymi tylko zmienną dyskryminującą  $B_2$  (równania (8) i (9)) i zaproponowanymi w analizie DF dla grupy związków o znanych OUN+ i OUN- [P-5]. Związki te badano też w poszerzonej analizie MLR, opartej tylko na wskaźnikach  $B_1$  i  $B_2$ .

Doświadczenie było, w założeniu, dowodem skuteczności działania, ustalonych wcześniej [P-5], narzędzi do przewidywania biodostępności w OUN przy minimalnym dostępie do danych doświadczalnych, a nawet wobec braku próbek związków analizowanych. W tym przypadku nawet oczekiwane wskaźniki OUN+/- były tylko logicznym domniemaniem.

Przeprowadzono analizę MLR dla obliczeniowych wskaźników przenikania BBB –  $B1$  i  $B2$ , jako zmiennych zależnych. Wskaźniki przenikania porównywano z danymi chromatograficznymi uzyskanymi dla 18 związków. Analiza wykazała silną zależność ( $R = 0,91$ ,  $n = 18$ ) i ( $R = 0,87$ ,  $n = 18$ ) odpowiednio ze zmiennymi  $B1$  i  $B2$ . Oba modele zawierają istotne statystycznie zmienne –  $R_f$  i  $R_f/PSA$ . Analiza zależności  $B1$  i  $B2$  od fizykochemicznych zmiennych niezależnych, obliczonych dla 18 związków, wykazała istotne korelacje z tymi samymi deskryptorami:  $HA$ , miarą pola powierzchni cząsteczki –  $S_a$  i  $DM$ . Współczynnik korelacji dla  $B1$  wynosił  $R = 0,98$  ( $n = 18$ ) i dla  $B2$   $R = 0,95$  ( $n = 18$ ). Parametry użyte w obu modelach są tradycyjnie związane z możliwością pokonywania BBB [113]. Połączenie parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych w kolejnej krokowej analizie MLR 18 związków i zmiennych zależnych  $B1$  i  $B2$  spowodowało wprowadzenie do obu modeli zmiennych:  $HA$ ,  $S_a$ ,  $DM$  i  $R_f/PSA$ . Współczynnik korelacji dla  $B1$  wynosił ponownie  $R = 0,98$  ( $n = 18$ ), zaś dla  $B2$  wzrósł do  $R = 0,96$  ( $n = 18$ ). Powstałe modele tłumaczą 93-96% całkowitej zmienności obliczeniowych wskaźników przenikania BBB. Wszystkie modele MLR zostały potwierdzone analizą walidacji krzyżowej LOO i LMO [P-6].

Analiza MLR przenikania bariery krew-mózg, oparta na obliczonych danych fizykochemicznych, została również przeprowadzona dla całej grupy 27 związków. Badanie zmiennej zależnej  $B1$  metodą krokową wprowadziło do modelu trzy zmienne:  $HA$ ,  $DM$  i  $\log D$ . Te same zmienne znalazły się w modelu zmiennej zależnej  $B2$ . Bardzo podobny był również wynik w postaci współczynnika korelacji ( $R = 0,95$ ) dla  $B1$  i dla  $B2$ . Oba modele zostały pomyślnie potwierdzone walidacją krzyżową [P-6].

Typowa analiza funkcji dyskryminacyjnej nie mogła być przeprowadzona, z powodu braku dostępnych informacji o zdolności przenikania 27 badanych przypadków przez BBB. Ponieważ jednak ich stosowanie w preparatach farmaceutycznych i kosmetycznych powinno być oparte na bezpiecznym braku dostępu do OUN, przyjęto oczekiwaną charakterystykę wszystkich przypadków, jako OUN-. Zastosowano funkcje klasyfikacyjne (uzyskane w poprzednim doświadczeniu [P-5]) z DFA dla 24 związków z oznaczonym  $BBvivo$  i znanej



zmiennej dychotomicznej OUN+/- . Funkcje te powstały na bazie zmiennych dyskryminujących, ustalonych dla przypadków, w większości posiadających charakterystykę OUN+. Z funkcji klasyfikacyjnych trzech wcześniejszych modeli DFA, przedstawionych jako równania **(8)**-**(13)**, obliczono wartości liczbowe. Podstawiono wartości zmiennych dyskryminujących aktualnie badanej grupy. Modele zbudowane są z parametru obliczeniowego  $B2$  i parametrów chromatograficznych  $R_f$  oraz  $R_f/PSA$ . 18 związków mogło być wprowadzonych do wszystkich trzech modeli, zaś 9 związków mogło zostać zbadanych tylko równaniem **(8)** i **(9)** (brak danych chromatograficznych). Najprostszy model, z jedną zmienną dyskryminującą –  $B2$  (równania **(8)**, **(9)**) przypisał 5 przypadków z 27 do grupy OUN+.

$$\text{CNS-} = -7.92822 B2 - 5.68942 \quad \text{(8)}$$

$$\text{CNS+} = 3.741167 B2 - 0.800563 \quad \text{(9)}$$

Klasyfikacja 18 związków, oparta na równaniach **(10)** i **(11)** ze zmiennymi dyskryminującymi  $B2$  i  $R_f/PSA$ , wykazała 3 przypadki sklasyfikowane jako OUN+.

$$\text{CNS-} = -10.8254 B2 + 3.2154 R_f/PSA - 6.3785 \quad \text{(10)}$$

$$\text{CNS+} = 5.32916 B2 - 1.76240 R_f/PSA - 1.00757 \quad \text{(11)}$$

Zastosowanie równań **(12)** i **(13)**, ze zmiennymi  $B2$ ,  $R_f/PSA$  i  $R_f$ , przypisuje tylko 1 z 18 przypadków do grupy OUN+.

$$\text{CNS-} = -11.0097 B2 + 3.3794 R_f/PSA - 0.1001 R_f - 6.3790 \quad \text{(12)}$$

$$\text{CNS+} = 14.8311 B2 - 10.2176 R_f/PSA + 5.1625 R_f - 2.5181 \quad \text{(13)}$$

Uzyskany wynik uznano za pozytywny. Potwierdził on możliwe względne bezpieczeństwo stosowania badanych związków promieniochronnych i konserwujących poprzez brak dostępu do OUN. Ważnym wnioskiem jest potwierdzenie uniwersalnego charakteru i skuteczności funkcji klasyfikacyjnych przedstawionych wcześniej **[P-5]** do przewidywania możliwości przenikania BBB. Przewidywanie to jest możliwe dla związków dostępnych w bardzo małych ilościach, wystarczających do zastosowania modelu chromatograficznego, a nawet dla niedostępnych w postaci próbek. Wynik potwierdza też możliwość oceny przypadków o innych właściwościach (OUN-), tym samym algorytmem.

Badania poświęcone grupie substancji promieniochronnych i pomocniczych, stosowanych w recepturze kosmetycznej i farmaceutycznej, udowodniły skuteczność przedstawionego chromatograficznego modelu analitycznego (RP-18 TLC). Dane chromatograficzne są zależne od parametrów, opisujących przenikanie związków do mózgu.

Odrębność właściwości i działania tej grupy związków potwierdziła uniwersalny charakter zaprezentowanego modelu analitycznego. Korelacje danych chromatograficznych z obliczeniowymi wskaźnikami przenikania BBB ( $B1$ ,  $B2$ ) są duże i istotne statystycznie. Korelacje te uzupełniają zmienne fizykochemiczne związane z przenikaniem BBB. Dzięki potwierdzeniu zdolności dyskryminujących wskaźnika  $B2$  oraz parametrów chromatograficznych, mogą być one stosowane do wstępnego przewidywania biodostępności w OUN dla związków dostępnych w bardzo małych ilościach, a nawet fizycznie niedostępnych (np. planowane struktury). Model chromatograficzny i obliczeniowe wskaźniki  $\log BB$  mogą być stosowane do badania związków chemicznych o różnej budowie [P-6] i działaniu.

Dobre wyniki stosowania modelu analitycznego RP-18 TLC i modeli matematycznych mogły częściowo wynikać z niewielkiej liczebności badanych grup przypadków [P-5, P-6] lub z ich podobieństwa strukturalnego [P-4]. Konieczne było więc potwierdzenie skuteczności modelu analitycznego i proponowanej metody badaniem dużej grupy przypadków o znacznym zróżnicowaniu struktury i miejsca działania – potwierdzenie uniwersalności strukturalnej, efektywności modelu i predykcyjnej wartości metody. W tym celu analizie poddano grupę 154 przypadków o znacznej zmienności strukturalnej i różnym działaniu [P-7]. Dla 46 przypadków zgromadzono dane z badania *in vivo* [93] –  $BB_{vivo}$ , a dla 111 związków ustalono wskaźnik OUN $\pm$  [94]. Wszystkie 154 związki opisano obliczonymi parametrami fizykochemicznymi oraz uzyskanymi danymi chromatograficznymi w modelu RP-18 TLC.

Analizę rozpoczęto od grupy 46 związków z danymi  $BB_{vivo}$ . Zbadano w tej grupie korelacje parametrów chromatograficznych ze wszystkim wskaźnikami przenikania BBB. Podobnie, jak w poprzednich badaniach, najgorszy wynik uzyskano dla zmiennej  $BB_{vivo}$ . Współczynnik korelacji wynosił tu zaledwie  $R = 0,38$  ( $n = 46$ ). Dla zmiennej  $B1$  był lepszy –  $R = 0,44$  ( $n = 46$ ), a najwyższy dla  $B2$  –  $R = 0,67$  ( $n = 46$ ). Z tego powodu dalsze analizy prowadzono z użyciem  $B2$ , jako obliczeniowego wskaźnika przenikania BBB. We wszystkich modelach MLR z udziałem danych chromatograficznych znalazły się zmienne  $R_f$  i  $R_f/PSA$ .

Badając grupę 46 przypadków, wykonano też analizę krokową MLR z użyciem wszystkich parametrów fizykochemicznych. Analiza dla zmiennej  $BB_{vivo}$  wprowadza kolejno:  $\log D$ , energię orbitalu HOMO –  $eH$  oraz  $DM$  i osiąga wartość  $R = 0,77$ . Analiza dla

zmiennej  $B2$ , w tej samej grupie, wprowadza:  $HA$ ,  $DM$ ,  $HD$ , ale osiąga znaczący współczynnik korelacji  $R = 0,96$  ( $n = 46$ ). Rozszerzenie krokowej analizy MLR dla  $B2$  w grupie wszystkich 154 analizowanych przypadków tylko nieznacznie obniżyło korelację, opartą na zmiennych:  $HA$ ,  $HD$ , energii orbitalu LUMO –  $eL$  ( $R = 0,94$   $n = 154$ ). Tak nieznaczne zmniejszenie korelacji potwierdza uniwersalny charakter parametrów fizykochemicznych opisujących wskaźnik  $B2$ .

Następnie wprowadzono do analizy MLR zmienne fizykochemiczne łącznie z danymi chromatograficznymi. Zarówno model matematyczny dla  $BBvivo$ , jak i dla  $B2$  miały teraz lepsze parametry, a szczególnie współczynnik korelacji. Dla  $BBvivo$  pojawiły się kolejno zmienne:  $\log D$ ,  $HA$ ,  $R_f$ ,  $eL$ ,  $R_f/PSA$  i objętość van der Waalsa  $V$ ,  $R = 0,80$  ( $n = 46$ ). Dla  $B2$  zmienne w modelu to:  $HA$ ,  $HD$ ,  $eH$  i  $R_f/PSA$ ,  $R = 0,97$  ( $n = 46$ ). Tę samą analizę wskaźnika  $B2$  przeprowadzono dla całej grupy przypadków. Uzyskano również dobry wynik  $R = 0,94$  ( $n = 154$ ) wprowadzono zmienne:  $HA$ ,  $HD$ ,  $eH$ ,  $eL$ ,  $R_f$  i  $R_f/PSA$ . Analiza MLR objaśnia 90% całkowitej zmienności wskaźnika  $B2$ .

Sprawdzono też możliwość wykorzystania modelu zaproponowanego wcześniej [P-5], do którego zastosowano wyznaczone i obliczone zmienne:  $HA$ ,  $HD$  i  $R_f/PSA$  (metodą standardową). Powstały model matematyczny ( $R = 0,93$ ,  $n = 154$ ) tłumaczy również 90% zmienności  $B2$ , co jest bardzo dobrym wynikiem w badaniu grupy 154 przypadków o bardzo zróżnicowanej strukturze i działaniu. Procent objaśnionej wariancji całkowitej  $B2$  nie zmienia się w obu modelach MLR ( $n = 46$  i  $n = 154$ ).

Udowodniono w ten sposób, że:

- zwiększenie grupy badanych przypadków nie pogarsza wyników analizy,
- wprowadzenie danych chromatograficznych do modelu zawsze korzystnie wpływa na wynik,
- proste modele, proponowane wcześniej [P-5], są odporne na zwiększenie liczby przypadków oraz na zmianę zakresu wariancji zmiennych niezależnych.

W pracy [P-7] przeprowadzono też analizę DF, która stworzyła funkcje klasyfikacyjne dla obu zestawów przypadków, tych z ustaloną zmiennością  $BBvivo$  oraz dla poszerzonej grupy. Niestety możliwość badania została ograniczona łącznie do 111 przypadków, dla których zgromadzono zmienną dychotomiczną OUN+/- . W grupie przypadków badanych *in vivo* była możliwość analizy 44 przypadków. Powstały tu funkcje klasyfikacyjne opisane zmiennymi dyskryminującymi:  $B2$ ,  $eL$  i  $R_f/PSA$ . Macierz klasyfikacji

wykazała całkowity procent poprawnie sklasyfikowanych przypadków na poziomie 97,7%. Uzyskane funkcje klasyfikacyjne były potwierdzone walidacją krzyżową, w której uzyskano identyczny wynik. Analiza DF wszystkich dostępnych 111 przypadków wprowadziła do modelu zmienne dyskryminujące:  $B_2$ ,  $eL$ ,  $HA$ ,  $\log D$  i  $R_f/PSA$  i osiągnęła wynik poprawnej klasyfikacji na poziomie 91,9%. Walidacja krzyżowa wykazała 92,04% przypadków poprawnie przypisanych do grup OUN+/-.

Funkcje klasyfikacyjne dla analizy DF zostały również potwierdzone walidacją grupy zewnętrznej przypadków. Dla rozdziału grupy 44 związków z *BBvivo* przeprowadzono walidację przy pomocy 67 związków (tylko z danymi chromatograficznymi i  $B_2$ ) – 15 OUN- i 52 OUN+. W wyniku walidacji: 6 z 15 związków OUN- i 2 z 52 OUN+ było błędnie sklasyfikowanych. Łącznie 88,06% przypadków grupy zewnętrznej zostało poprawnie ocenionych. Można uznać, że potwierdza to wartość DFA uzyskaną w [P-7].

Zbadano również skuteczność funkcji klasyfikacyjnych, uzyskanych w pracy [P-5] i potwierdzonych w [P-6] ze zmiennymi dyskryminującymi  $B_2$  i  $R_f/PSA$ . Badanie prowadzono dla tych samych 67 przypadków. Wyniki badania funkcji klasyfikacyjnych ustalonych w poprzednim DFA [P-5, P-6] wykazały: 1 błędnie przyporządkowany przypadek OUN- (15 badanych) i 7 błędnie przyporządkowanych przypadków OUN+ (52 przypadki). Łącznie poprawnie przypisanych 88,06% przypadków. Jest to bardzo dobry wynik, w przypadku zastosowania do kolejnej już grupy związków w liczbie 67 przypadków.

Jak już wspomniano, w chwili obecnej podstawową techniką chromatograficzną, służącą do naśladowania *in vitro* zjawisk ADME, zachodzących w żywych organizmach jest chromatografia IAM [P-3]. Retencja na stosowanych w niej fazach stacjonarnych, dość dobrze naśladujących błony biologiczne, zależy od właściwości fizykochemicznych substancji, odpowiedzialnych jednocześnie za ich biodostępność. Zachęcona powodzeniem podjętych wcześniej prób prognozowania przenikania przez barierę krew-mózg za pomocą chromatografii cienkowarstwowej RP-18 TLC [P-5, P-6, P-7], postanowiłam zwrócić się w kierunku chromatografii kolumnowej, ale również na fazie stacjonarnej RP-18, stanowiącej ogromnie uproszczony, ale jak pokazały wcześniejsze badania, zaskakująco skuteczny model przewidywania zdolności przekraczania BBB. Opierając się na uzyskanych dotychczas pozytywnych wynikach modelowania biodostępności w OUN, z zastosowaniem parametrów  $R_f$  i  $R_f/PSA$  (RP-18 TLC) zbadalam parametry retencji RP-18 HPLC  $\log k$  i  $(\log k)/PSA$  w podobnej roli [P-8]. Analiza miała na celu porównanie modelu TLC i HPLC w tych

samych warunkach układu i składu faz. Chciałam wskazać najlepszą i uniwersalną metodę analityczną badania przenikania BBB za pomocą sorbentu RP-18.

Dane chromatograficzne, wykorzystane w przedstawionych [P-8] analizach uzyskano na kolumnie LiChospher 100 RP-18 (5  $\mu\text{m}$ ), stosując fazę ruchomą o składzie acetonitryl-bufor fosforanowy pH 7,4 (1:1 v/v), z szybkością przepływu 1,0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  (substancje wprowadzano w postaci roztworów o stężeniu 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  w metanolu, objętość wprowadzanego roztworu – 1  $\mu\text{L}$ ). Badano korelacje między zdolnością analitów do przekraczania bariery krew-mózg mierzoną *in vivo* (*BBvivo*) a danymi chromatograficznymi, uzyskanymi w tak przeprowadzonych doświadczeniach:  $\log k$  i  $(\log k)/PSA$  dla 110 związków. Stwierdzono, że korelacje te pozostają na podobnym poziomie, jak pomiędzy *BBvivo* oraz deskryptorami, uzyskanymi w wyniku chromatografii cienkowarstwowej  $R_f$  and  $R_f/PSA$  (tzn. objaśniają ok. 15% całkowitej zmienności *BBvivo*).

Analizowano także korelacje między parametrami chromatografii kolumnowej, a stosowanym w poprzednich pracach [P-5, P-6, P-7] współczynnikiem przenikalności przez BBB –  $B_2$ , uwzględniając 40 przypadków o znanej przenikalności *BBvivo*. Stwierdzono, że korelacja pomiędzy  $B_2$  i danymi chromatograficznymi  $\log k$  i  $(\log k)/PSA$  jest na poziomie znacząco niższym, niż miało to miejsce w przypadku  $R_f$  i  $R_f/PSA$  ( $R^2 = 0,44$  [P-7]) i wyjaśnia tylko 10% zmienności całkowitej  $B_2$ . W przypadku obliczanego współczynnika przenikalności przez BBB ( $B_2$ ) możliwa była oczywiście także analiza jego korelacji z parametrami chromatografii HPLC dla całej grupy 110 przypadków, jednak otrzymany model, wyjaśniający zaledwie ok. 20% zmienności  $B_2$ , ponownie wskazał na przewagę chromatografii cienkowarstwowej, jako źródła informacji o zdolności substancji do przekraczania bariery krew-mózg (analogiczny model, oparty na chromatografii cienkowarstwowej [P-7] objaśnia ponad 30% zmienności  $B_2$  dla 154 przypadków).

Analiza MLR, obejmująca dane fizykochemiczne, związane z biodostępnością w OUN oraz dane chromatograficzne, potwierdziła zasadność łączenia parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych (HPLC na fazie stacjonarnej RP-18) w modelowaniu przenikalności przez barierę krew-mózg. Otrzymane modele matematyczne objaśniały 70-96% całkowitej zmienności  $B_2$ , jako biodostępności w OUN oraz wskazywały na ważną rolę deskryptorów fizykochemicznych. Wprowadzenie w analizie krokowej MLR danych chromatograficznych HPLC bez wątplenia ukazuje ich związek z *BBvivo* i  $B_2$ , ale w odróżnieniu od chromatografii cienkowarstwowej ( $R_f/PSA$ ) [P-5, P-6, P-7] nie potwierdzono

znaczenia modyfikacji danych chromatograficznych za pomocą parametru  $PSA$ , prowadzącej do uzyskania parametru  $(\log k)/PSA$ . Niemniej jednak, wprowadzenie parametru chromatograficznego  $\log k$  zwiększa wiarygodność modelu i poprawia jego statystyki - **(15)** w porównaniu z **(14)**.

$$BBvivo = 3.96(\pm 1.15) + 0.26(\pm 0.06) \log D - 0.02(\pm 0.06) HA - 0.13(\pm 0.04) DM + 0.36(\pm 0.16) eH - 0.22(\pm 0.13) V \quad (14)$$

$$R = 0.79 \quad R^2 = 0.62, \quad F(5,34) = 10.955 \quad p < .00000, \quad s = 0.52755 \quad n = 40$$

$$BBvivo = 5.11(\pm 0.15) + 0.22(\pm 0.06) \log D + 0.02(\pm 0.06) HA - 0.13(\pm 0.04) DM + 0.48(\pm 0.16) eH + 0.34(\pm 0.13) \log k - 0.32(\pm 0.12) V \quad (15)$$

$$R = 0.83 \quad R^2 = 0.68, \quad F(6,33) = 11.864 \quad p < .00000, \quad s = 0.48697 \quad n = 40$$

Parametr  $\log k$  pojawia się w każdym modelu, korzystającym z danych chromatograficznych, natomiast  $(\log k)/PSA$  albo nie jest w analizie krokowej wprowadzany, albo jego pojawienie się nie wpływa na poprawę wyniku.

Analiza dyskryminacyjna, oparta na grupie przypadków o znanym wskaźniku  $BBvivo$ , pozwala na odróżnienie substancji z grup OUN+ i OUN- ze 100% skutecznością. Walidacja równań **(16)** i **(17)**, definiujących te grupy za pomocą 61 przypadków bez znanej wartości  $BBvivo$ , ale o ustalonej biodostępności OUN+/- znanej ze źródeł literaturowych, potwierdziła ich przydatność - zgodność klasyfikacji, uzyskanej na podstawie równań **(16)** i **(17)** z danymi literaturowymi wynosiła 88%.

$$CNS- = 3,17303 HD + 2,58165 DM + 1,83146 V - 1,22831 eH - 1,18040 \log k - 7,18797 \quad (16)$$

$$CNS+ = - 0,5599 HD - 0,4555 DM - 0,3231 V + 0,2167 eH + 0,2083 \log k - 0,3272 \quad (17)$$

Analiza dyskryminacyjna dla wszystkich 101 substancji o znanym parametrze jakościowym OUN+/- okazała się skuteczna w 95% przypadków, potwierdzając tym samym przydatność modelu analitycznego, opartego na danych chromatograficznych RP-18 HPLC w prognozowaniu przenikalności przez BBB.

Końcowe porównanie skuteczności predykcyjnej modeli RP-18 TLC i RP-18 HPLC [P-8] wykazało, że chromatografia cienkowarstwowa RP-18 TLC wykazuje pewną przewagę nad RP-18 HPLC, w szczególności wynikającą z istnienia parametru  $R_f/PSA$ , który umożliwia rozróżnienie związków przekraczających barierę krew-mózg i tych, które jej nie przekraczają [P-7]. Nie potwierdzono skutecznego stosowania analogicznego parametru w przypadku chromatografii kolumnowej, w badanych przeze mnie warunkach. Równocześnie niski koszt, dostępność i prostota wykonania eksperymentów metodą TLC świadczą o większej przydatności tej metody w przewidywaniu biodostępności w OUN *in vitro*.

### 4.3.3. Podsumowanie

W wyniku przeprowadzonych prac, zrealizowałam wszystkie zamierzone cele.

Opracowania o charakterze przeglądowym [P1, P3] pozwoliły mi na analizę możliwości zastosowania środowiska chromatograficznego do modelowania wielu zjawisk biologicznych, którym podlegają leki w organizmie pacjenta. Prognozowanie przebiegu tych zjawisk, od wielu lat, pozwala na poszerzanie zastosowań analizy *in vitro* i zwiększanie zakresu badań chemii medycznej (poszukiwania nowych substancji czynnych i optymalizacji działania istniejących leków). Modele chromatograficzne stosowane są również do ustalania wiarygodnych miar niektórych właściwości fizykochemicznych związków, decydujących o ich działaniu biologicznym.

Jednym z ważnych parametrów, istotnie wpływającym na wchłanianie i dystrybucję leku, jest lipofilowość. Znanych jest bardzo wiele metod jej wyznaczenia, zwłaszcza metodami podziałowymi, oraz obliczania. Analiza porównawcza istniejących i opracowanie nowych metod chromatograficznego wyznaczenia lipofilowości niektórych składników preparatów leczniczych i kosmetycznych oraz porównanie ich z metodami obliczeniowymi [P-2], pozwoliły na ocenę możliwości przed wyborem wiarygodnej metody stosowanej w pracy. Badania wykazały, że wyznaczenie lipofilowości metodami chromatograficznymi ma znaczne ograniczenia. Pracochłonne doświadczenie nie jest również uniwersalne w stosunku do zróżnicowanych strukturalnie analitów. Doświadczenia te wykazały równocześnie zbieżność wyników zastosowania metod obliczeniowych współczynnika podziału z wartością  $\log P_{exp}$ , wyznaczonego dla tych samych związków. Dzięki temu, decyzja o metodzie ustalenia lipofilowości, wśród wielu innych parametrów fizykochemicznych, dla dużej liczby przypadków o bardzo zróżnicowanej strukturze, zapadła

na korzyść metod obliczeniowych. Wartości  $\log P$ , wyznaczone tą samą metodą dla wszystkich zaplanowanych przypadków w doświadczeniu, pozwoliły na obliczenie wskaźnika przenikania BBB –  $BI$ . Indywidualnie  $\log P$  nie pojawił się jednak w żadnym powstałym modelu matematycznym, opisującym to zjawisko.

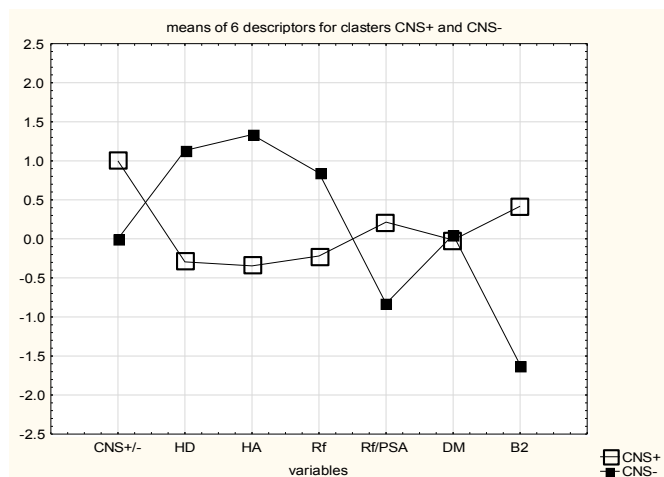
Obserwowano różne wskaźniki przenikania BBB, pochodzące z badań *in vivo* i obliczeniowe [P-4, P-5, P-6, P-7, P-8]. Na podstawie kolejnych analiz ustalono, że obliczeniowe parametry  $\log BB$  mają wielkie znaczenie i są wiarygodne w badaniu leków, których działanie zależne jest od biodostępności w OUN. Ustalono, dla bardzo dużej liczby związków, kilka innych parametrów fizykochemicznych wyraźnie rozróżniających leki przenikające (OUN+) i nie przenikające (OUN-) BBB. Parametry te należały do znanych wskaźników potencjalnej zdolności pokonywania tej bariery „Reguła 5”.

W kolejnych doświadczeniach [P-5, P-6, P-7, P-8] zaplanowałam i przeprowadziłam badania służące ustaleniu warunków doświadczenia chromatograficznego RP-18, które pozwalają zwiększyć wiarygodność analizy QSAR w przewidywaniu biodostępności leków oraz innych związków chemicznych do ośrodkowego układu nerwowego. Wybrałam i opracowałam grupy związków przeznaczonych do badań: związki działające w OUN, związki nie przenikające BBB, liczne związki dodatkowe o zróżnicowanej strukturze. Zgromadziłam dostępne wyniki badań *in vivo* zdolności przenikania BBB i ustaliłam dane o właściwościach fizykochemicznych, wynikających ze struktury przestrzennej związków, po optymalizacji geometrycznej. Ustaliłam też warunki doświadczeń chromatograficznych, jako podstawę modelu analitycznego przenikania BBB. Model ten oparty jest na wartościach współczynnika zatrzymania  $R_f$ , uzyskanych w łatwych do odtworzenia warunkach chromatografii cienkowarstwowej na fazie stacjonarnej RP-18 F254s (Merck), z fazą ruchomą acetonitryl-bufor fosforanowy pH 7,4 (Sigma-Aldrich) 70:30 (v/v). Stosowane płytki chromatograficzne przed naniesieniem badanych substancji pasażowano mieszaniną metanol-dichlorometan 1:1 (v/v) i pozostawiono do wyschnięcia w temperaturze pokojowej (24 h). Płytki chromatograficzne rozwijano w komorach chromatograficznych pionowych, wyłożonych bibułą filtracyjną i nasyconych parami fazy ruchomej przez 20 min. Substancje наносono w postaci roztworów w metanolu ( $1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ , objętość наносzenia  $1 \mu\text{L}$ ), w odległości 15 mm od dolnej krawędzi płytki, w odstępach 8 mm; płytki rozwijano do wysokości 95 mm.



Na podstawie doświadczenia [P-5] wykazałam ścisły związek danych chromatograficznych RP-18 TLC, w ustalonych warunkach, definiujących model analityczny, z biodostępnością leku w OUN i potwierdziłam wartość obliczeniowych parametrów  $\log BB - B1$  oraz  $B2$ . W połączeniu z obserwacją danych fizykochemicznych i analizą chemometryczną ustalono modele matematyczne, użyteczne w przewidywaniu zdolności przekraczania bariery krew-mózg. W badaniach leków działających w OUN, przenikanie BBB może być prognozowane również bez dostępu do wyników badań *in vivo* ( $BB_{vivo}$ ). Wykorzystywane analizy: MLR i DFA wyłoniły grupę parametrów fizykochemicznych i chromatograficznych, ważnych dla biodostępności leków do OUN. Parametry fizykochemiczne należały do znanych wskaźników potencjalnej zdolności pokonywania tej bariery („Reguła 5”), co potwierdziło wnioski z poprzedniej pracy [P-4]. Zastosowanie CA podkreśla zróżnicowanie ich średnich wartości w grupach OUN+ i OUN- (Rys. 5).

Rys. 5. Średnie wartości 6 deskryptorów w analizie skupień OUN+ i OUN- (metoda k-średnich)



Badania te dotyczyły leków, w większości aktywnych w OUN [P-5].

Na podstawie doświadczeń [P-5, P-6, P-7] wykazałam przydatności zaproponowanej metodologii przewidywania zdolności przekraczania bariery krew-mózg na przykładzie:

- związków o udowodnionej biodostępności do OUN (leki działające w ośrodkowym układzie nerwowym) [P-5],
- związków nie przenikających BBB (składniki preparatów o działaniu naskórnym – związki promieniochronne i konserwanty) [P-6],

- dużej grupy analitów o zróżnicowanej budowie chemicznej i działaniu biologicznym [P-7].

Zdefiniowany model analityczny jest uniwersalny pod względem możliwości badania analitów o znacznej zmienności strukturalnej, dla których może służyć do przewidywania zdolności przenikania bariery krew-mózg. Zwraca w nim uwagę powtarzającą się obecność zmiennej  $R/PSA$  we wszystkich analizach statystycznych [P-5, P-6, P-7], jako ważnego parametru opisującego przenikanie BBB.

Istnieje wiele parametrów uproszczonego przewidywania możliwości przenikania leków do OUN. Deskryptory molekularne, opisujące właściwości fizykochemiczne zgromadzone w grupie nazywanej „Regułą 5” ustalono na podstawie badania tysięcy związków [113]. Określają one przybliżone zakresy wartości ilościowych dla poszczególnych parametrów, które zwiększają prawdopodobieństwo dystrybucji przez BBB. Skomplikowane schematy oddziaływań leku z barierą krew-mózg *in vivo* powodują rozbieżności wyników zastosowania tych zasad. Liczne sorpcje i desorpcje leku na drodze wchłaniania i dystrybucji pogłębiają te różnice. Badanie struktury i właściwości fizykochemicznych, wynikających z budowy związku, jest kluczowe, jednak zwykle niewystarczające do ilościowego opisu efektu dystrybucji.

Wszystkie parametry, proponowane w grupie „Reguła 5”, posiadają stosunkowo wąskie zakresy wartości skuteczne dla przenikania BBB (OUN+). Poszerzenie lub przesunięcie tych zakresów związane jest często ze zmianą innych, towarzyszących właściwości związków. Istnieją bardzo nieliczne modele matematyczne działania biologicznego oparte na jednej zmiennej niezależnej. Możliwość przewidywania przenikania leku do mózgu na podstawie obserwacji samych tylko właściwości fizykochemicznych jest więc ograniczona. Stosowane są pochodne tych parametrów. Z połączenia dwóch pojedynczych powstały:  $\log P - (N+O)$ ,  $\%PSA$  ( $PSA$  i  $S_A$ ). Często stosowane są też pochodne logarytmiczne (np.  $\log M_w$ ,  $\log P$ ,  $\log D$ ), które służą lepszemu dopasowaniu do skomplikowanych zjawisk behawioralnych (z tendencją do osiągnięcia stanu równowagi) lub do innych logarytmicznych miar działania ( $pA_2$ ,  $pD_2$ ,  $\log BB$  itd.).

Jeśli związki badane są dostępne, można obserwować ich zachowanie w specjalnie dobranych modelach analitycznych, imitujących warunki *in vivo*. Subtelne odmienności takiego zachowania muszą być wzmocnione i wręcz zwielokrotnione, aby mogły być dostrzeżone i odwzorowane ilościowo. Zastosowanie metody chromatograficznej daje takie możliwości, zarówno w badaniu biodostępności OUN [48, P-5, P-6, P-7], jak i w innych

obszarach chemii medycznej [47, P-1, P-3]. Modele analityczne służą do obserwacji i porównywania związków chemicznych o dużej zmienności cech fizykochemicznych. W przypadku modeli chromatograficznych, wymaga to zastosowania układu faz, umożliwiającego badanie wszystkich interesujących przypadków bez zmiany warunków. Każdy model chromatograficzny imituje złożone warunki oddziaływań *in vivo* i musi, w sposób uproszczony, reprezentować to właśnie zjawisko, nie zaś tylko cechy uniwersalne podstawowego rozdziału chromatograficznego. Dlatego konieczne jest wprowadzenie szczególnych wyróżników, odnoszących się do badanego zjawiska biologicznego.

Biodostępność związana jest np. ze stopniem jonizacji związku. Badane przenikanie BBB odbywa się z krwi. Zastosowanie w chromatografii fazy ruchomej, buforowanej do pH 7,4, jest takim elementem środowiska fizjologicznego. Powinowactwo fazowe w mechanizmie adsorpcyjnym retencji ma podłoże hydro-lipofilowe. Istotną cechą są również oddziaływania hydrofobowe. Ponadto faza RP-18 posiada cechy podłoża pseudo-adsorpcyjnego.

Biorąc pod uwagę duże znaczenie obliczonych wskaźników  $\log BB - B1$  i  $B2$  ujawnione we wszystkich analizach [P-4, P-5, P-6, P-7], wprowadziłam element związany teoretycznie z przenikaniem BBB, opisujący strukturę cząsteczki i występujący w algorytmach  $B1$  i  $B2$  (wartość  $PSA$ ), tworząc nowy deskryptor w postaci:  $R_f/PSA$ .

Uwzględnienie miary polarnego pola powierzchni analitu ( $PSA$ ) wzbogaca efekt rozdziału chromatograficznego ( $R_f$ ) o właściwości ściśle związane z modelowanym zjawiskiem przenikania BBB. Wydaje się, że uwzględnienie  $PSA$  molekuł poszerza też możliwości obserwacji analitów o różnej budowie. Wariancja zmiennej  $R_f/PSA$  jest większa, niż zmiennej  $R_f$  w badanej grupie związków. Dotychczasowe doświadczenia [P-5, P-6, P-7] potwierdzają znaczenie parametru  $R_f/PSA$ , jako najlepiej powiązanego ze wskaźnikiem OUN+/-.

Na tej podstawie wywnioskowano, że dane chromatograficzne uzyskane w doświadczeniu: RP-18 TLC z fazą ruchomą o składzie acetonitryl-bufor fosforanowy (pH 7,4) 70:30 (v/v) mogą być stosowane do przewidywania przenikania BBB w połączeniu z parametrami fizykochemicznymi.

Zakres wartości parametru  $R_f/PSA$ , wskazujący na prawdopodobną biodostępność w OUN wynosił, w grupie 34 przypadków badanych uprzednio [P-5], dla OUN+  $\geq 0,009$  i dla OUN-  $< 0,009$  (bez błędów). Warto dodać, że wartości danych  $R_f$  dla tej samej grupy przypadków znalazły się w przedziale 0,22-0,84 (dla OUN+) i 0,49-0,83 (dla OUN-), a więc

sama wartość współczynnika zatrzymania  $R_f$  nie zapewniała skutecznego rozróżnienia substancji o właściwościach OUN+ i OUN-.

W identycznym doświadczeniu dla 111 przypadków, przedstawionym w [P-7] (21 przypadków ze zdefiniowanym wskaźnikiem OUN- i 90 przypadków OUN+), wartości parametru  $R_f/PSA$ , wynosił: dla OUN+  $\geq 0,009$  (14 błędów z wartością od 0,004-0,008) i dla OUN-  $< 0,009$  (3 błędy z wartością od 0,0092-0,0099); wartości danych  $R_f$  w tej samej grupie znalazły się w przedziale 0,10-0,90 dla OUN+ i 0,50-0,90 dla OUN-. Wyniki te wskazują wyraźnie na znacznie większą stabilność parametru  $R_f/PSA$  w stosunku do znacznej zmienności strukturalnej związków i ich przewidywanej zdolności przenikania BBB. Tak więc wprowadzony parametr  $R_f/PSA$  RP-18 TLC może być stosowany jako jeden ze wskaźników przenikania BBB, jako uzupełnienie grupy deskryptorów "Reguły 5".

Bardzo stabilny jest również w tym doświadczeniu parametr  $B2$ . W grupie 111 przypadków ze zdefiniowaną biodostępnością OUN+/- ustalono wartości parametru  $B2$  dla 90 związków OUN+  $B2 \geq -0,9$ . Wykryto 6 błędów z wartością od  $-0,97$  do  $-1,38$ . Wartość parametru  $B2$  w grupie 21 przypadków OUN-  $B2 < -0,9$ . Wykryto 3 błędy z wartością od  $-0,41$  do  $-0,81$ .  $B2$  dla związków z oznaczonym  $BBvivo$  mieściły się w tych samych wartościach granicznych. Wśród 6 przypadków OUN- wykryto 2 błędy oraz w grupie 39 przypadków OUN+ odnaleziono również 2 błędy [P-7]. Podobnie, wartości oznaczonego parametru  $BBvivo$  wynosiły dla OUN+  $BBvivo > -0,9$  i dla OUN-  $BBvivo < -0,9$ .

Udowodniono, że powstałe modele mogą być skutecznie stosowane w grupach leków o różnej budowie [P-6, P-7]. Zwiększanie liczebności grupy przypadków nie zmniejszało zdolności predykcyjnej modeli, a niekiedy ją zwiększało. Łącznie zbadano grupę 154 przypadków o znacznej zmienności strukturalnej. Wskaźniki  $\log BB$  ( $B2$ ) i dane chromatograficzne ( $R_f/PSA$ ) wykazały we wszystkich doświadczeniach [P-5, P-6, P-7] bardzo dużą stabilność granicy wartości charakterystycznej dla grup związków przenikających (OUN+) i nie przenikających (OUN-) przez BBB. Przedstawione modele matematyczne MLR i DFA posiadały dużą zdolność predykcyjną dla oceny OUN+/-.

W końcowej fazie wykonanych dotychczas prac [P-8] zbadalam możliwość zastosowania w tworzeniu modeli chromatograficzno-obliczeniowych przenikania BBB, parametrów retencji, uzyskanych w chromatografii kolumnowej RP-18 HPLC. Otrzymane wyniki są interesujące i świadczą o przydatności parametru chromatograficznego  $\log k$ , nie potwierdziły jednak znaczenia jego modyfikacji w postaci  $(\log k)/PSA$ . W szczególności nie

stwierdzono możliwości wyznaczenia wartości granicznych ( $\log k$ )/PSA (ani pozostałych, badanych w tymi kierunku parametrów HPLC –  $\log k$ ,  $k$  ani  $k/PSA$ ), umożliwiającą klasyfikację substancji jako OUN+ lub OUN-.

## **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych i dydaktycznych**

### **5.1. Liczbowe zestawienie dorobku naukowego**

#### **Prace oryginalne**

Łącznie – **23** (w tym **17** jako pierwszy lub jedyny autor)

Po uzyskaniu stopnia naukowego doktora – **21** prac

#### **Prace przeglądowe**

- łącznie – **5** publikacji (w tym jako pierwszy lub jedyny autor – 4 prace)

**Sumaryczny *impact factor* (IF) publikacji naukowych wg listy Journal Citation Reports (JCR) – 31,079**

**Liczba cytowań (ISI Web of Science Core Collection): 66, indeks Hirscha: 5**

**Liczba cytowań (Scopus): 69, indeks Hirscha: 5**

### **5.2. Omówienie działalności naukowo-badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora**

Moje zainteresowania naukowe, od czasu studiów na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej, koncentrowały się na zagadnieniach, związanych z chemią i technologią substancji biologicznie czynnych oraz recepturą preparatów farmaceutycznych i kosmetycznych, zawierających takie substancje. Zmieniał się natomiast sposób realizacji tych zainteresowań, co w znacznym stopniu spowodowane było charakterem jednostek naukowych i badawczo-rozwojowych, w których miałam przyjemność studiować lub pracować.

Pracę naukową rozpoczęłam w roku 1991, jako studentka IV roku studiów magisterskich na Wydziale Chemicznym Politechniki Łódzkiej - w ramach działalności Koła Naukowego, a następnie w trakcie realizacji pracy magisterskiej pod kierunkiem Prof. dr hab. Marka L. Głównki (Instytut Chemii Ogólnej i Ekologicznej PŁ) oraz Dr Zbigniewa Kamińskiego (Instytut Chemii Organicznej PŁ). Moje badania w tamtym okresie pozostawały w ścisłym związku z pracami Dr Zbigniewa Kamińskiego, dotyczącymi

zastosowania estrów 1,3,5-triazyny w reakcjach acylowania grupy aminowej, przeprowadzanych w procesie syntezy peptydów. Fakt, że synteza wiązania peptydowego jest o wiele łatwiejsza, gdy grupa karboksylowa aminokwasu zostanie zaktywowana poprzez estryfikację, zaobserwowano już w roku 1906. Stwierdzono, że reaktywność tak otrzymanych „estrów aktywnych” jest zróżnicowana i zależy m.in. od zdolności grup estryfikujących do zmniejszania gęstości elektronowej na atomie węgla grupy karboksylowej aminokwasu acylującego, co zwiększa jego podatność na atak nukleofilowy grupy aminowej aminokwasu acylowanego. Na przestrzeni lat zaproponowano w roli odczynników acylujących szereg estrów o różnych aktywnościach, wywodzących się z aminokwasów i alkoholi alifatycznych, fenoli lub enoli, spośród których do najbardziej aktywnych należą estry 2,4-dimetoksy-1,3,5-triazynylowe. Ponieważ reaktywność niektórych estrów aktywnych jest zbyt duża, aby możliwe było badanie ich struktury metodami, wymagającymi długotrwałych pomiarów, pojawiła się koncepcja zastąpienia estrów eterami, jako związkami mniej aktywnymi od estrów, a wciąż zawierającymi wiązanie C-O-C, którego geometria, wg doniesień, decyduje o aktywności estrów aktywnych. Wkład mój w prace nad tym zagadnieniem polegał zarówno na syntezie nowych pochodnych - eterów arylowych 1,3,5-triazyny ulepszoną przeze mnie metodą, jak i badaniu ich właściwości technikami spektroskopowymi, magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$ NMR), podczerwieni oraz metodą rentgenografii strukturalnej monokryształu. Na dalszym etapie prac poszukiwałam związku pomiędzy aktywnością estrów fenoli i enoli w warunkach aminolizy a długością wiązań  $\text{C}_{\text{sp}^2}\text{-O}$  w cząsteczkach odpowiadających im eterów diaromatycznych. Otrzymane przez mnie wyniki zostały zawarte w mojej pracy magisterskiej oraz przedstawione w postaci komunikatu konferencyjnego na XXXIV Konwersatorium Krystalograficznym we Wrocławiu (1992) i dwóch prac oryginalnych, których jestem współautorką [*Pol. J. Chem.* **1994**; *Acta Cryst. C* **1994**].

W roku 1992, bezpośrednio po uzyskaniu dyplomu magistra inżyniera (z wyróżnieniem), jako laureatka stypendium ICI (Imperial Chemical Industry) dla młodych naukowców z krajów rozwijających się rozpoczęłam studia doktoranckie w zakresie chemii organicznej w Dyson Perrins Laboratory (Uniwersytet w Oksfordzie) pod kierownictwem Dr Jeremiego Robertsona. Moje zainteresowania naukowe w tym okresie dotyczyły syntezy totalnej substancji naturalnych. Głównym celem mojej pracy doktorskiej było opracowanie metody syntezy podstawowego elementu strukturalnego toksyny anyżku gwiazdzistego

anizatyny, z zastosowaniem wewnątrzcząsteczkowej reakcji enowej glioksylatu. Otrzymane półprodukty oraz końcowy produkt syntezy scharakteryzowałam przy pomocy magnetycznego rezonansu jądrowego ( $^1\text{H}$  NMR oraz  $^{13}\text{C}$ NMR), spektroskopii w podczerwieni oraz, w przypadku wybranych substancji, metodą rentgenografii strukturalnej monokryształu. Wyniki moich badań przedstawiłam na konferencji Royal Society of Chemistry (Sheffield 1995). Uwieńczeniem mojej pracy w Dyson Perrins Laboratory stała się rozprawa doktorska, którą obroniłam, uzyskując w 1997 stopień doktorski, zatwierdzony następnie przez Radę Wydziału Chemicznego Politechniki Łódzkiej.

### ***5.3. Działalność naukowo-badawcza po uzyskaniu stopnia doktora***

Po uzyskaniu stopnia doktora w latach 1998-2005 pracowałam w Dziale Badawczo-Rozwojowym F.K. Pollena-Ewa S.A. w Łodzi na stanowisku Specjalisty ds. Badawczo-Rozwojowych. Zajmowałam się tam opracowywaniem receptur preparatów kosmetycznych do pielęgnacji skóry, włosów i jamy ustnej w skali laboratoryjnej, przygotowywaniem opisów procesów technologicznych, wymagań jakościowych wraz z odpowiednimi procedurami analitycznymi oraz wprowadzaniem do produkcji na skalę przemysłową. Podczas pracy nad powierzonymi mi projektami, pogłębiałam znajomość receptury kosmetycznej i farmaceutycznej oraz chemii surowców kosmetycznych, jak również wiedzę na temat stosowanych w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym metod analitycznych kontroli jakości (z zakresu analizy klasycznej i instrumentalnej). W czasie mojej pracy w F.K. Pollena Ewa S.A. byłam autorką kilkuset receptur, z których kilkadziesiąt zostało wdrożonych do produkcji. Równoległe do pracy w zakresie recepturowania zajmowałam się analizą wpływu receptur preparatów do pielęgnacji skóry, opracowywanych w naszym Laboratorium na parametry takie, jak wilgotność, stopień natłuszczenia i pH naskórka. Uzyskane przeze mnie wyniki stały się podstawą opracowywanych w Dziale Badawczo-Rozwojowym materiałów informacyjnych o charakterze marketingowym i popularno-naukowym. Niestety, z uwagi na poufny charakter moich ówczesnych prac nie byłam w stanie opublikować większości uzyskanych przeze mnie w tym okresie wyników. Wyjątek stanowiły badania nad walorami aplikacyjnymi i profilaktycznymi opracowanych receptur linii wyrobów do pielęgnacji jamy ustnej Evadent (w szczególności płukanek) dla osób z nadwrażliwością szkliwa, wykonane we współpracy z Zakładem Stomatologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi. Uzyskane wyniki badań przedstawione zostały w

postaci komunikatów konferencyjnych (Zjazd Naukowy Sekcji Stomatologii Dziecięcej PTS Łódź 2002).

Podczas pracy w F.K. Pollena-Ewa S.A. zainteresowałam się zagadnieniami, pośrednio związanymi z pracą w zakresie receptury, a mianowicie wpływem surowców kosmetycznych na środowisko naturalne oraz możliwymi negatywnymi interakcjami tych surowców z organizmem użytkownika. Zainteresowania te mogłam głębiej rozwinąć po podjęciu w roku 2005 pracy w Zakładzie Chemii Analitycznej Uniwersytetu Medycznego w Łodzi, pod kierunkiem Pani Profesor Elżbiety Brzezińskiej. W szczególności przedmiotem moich prac z tego zakresu stały się małowcząsteczkowe surowce, stosowane w większości współcześnie produkowanych preparatów do ochrony i pielęgnacji skóry i włosów – substancje promieniochronne, barwniki syntetyczne i konserwanty. Substancje te przedostają się do środowiska naturalnego (zwłaszcza do ekosystemów wodnych) w ilościach tysięcy ton w skali roku i ulegają licznym przemianom chemicznym, w szczególności procesom fotochemicznym i katalitycznym oraz chlorowaniu wskutek oddziaływania wody chlorowanej. Nieprzetworzone surowce kosmetyczne oraz produkty ich przemian w środowisku gromadzą się w tkankach organizmów wodnych (w szczególności ryb) i wpływają na ich ważne procesy życiowe, zaburzając zwłaszcza funkcje rozrodcze. Surowce te są także uznawane za przyczynę niszczenia raf koralowych. Oprócz negatywnego wpływu surowców kosmetycznych na ekosystem, niektóre z nich, choć dopuszczone do stosowania w preparatach, wykazują niepożądaną skłonność do przekraczania bariery naskórka, a co za tym idzie, mogą ulegać dystrybucji i procesom metabolicznym w organizmie ludzkim. Z uwagi na możliwe negatywne skutki stosowania substancji promieniochronnych, barwników syntetycznych i konserwantów, substancje te podlegają ograniczeniom ustawowym zarówno co do sposobu użycia (rodzaj preparatów), jak i dopuszczalnej ich zawartości w recepturze. Dlatego tak istotne jest istnienie dostępnych pod względem aparaturowym, tanich i prostych metod oznaczania tych surowców w preparatach, matrycach wodnych, glebie, tkankach roślinnych i zwierzęcych oraz płynach ustrojowych. Opracowując tego rodzaju metody analityczne należy mieć jednocześnie na względzie fakt, że zarówno substancje promieniochronne, jak i konserwanty charakteryzuje w większości dość wąskie spektrum działania i dlatego występują one w preparatach najczęściej w postaci kilkuskładnikowych mieszanin, działających synergistycznie (np. filtry UV-A w połączeniu z UV-B).

Zdecydowana większość opracowanych dotychczas metod oznaczania substancji



promieniochronnych oparta jest na zastosowaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej; nieliczne publikacje na ten temat opisują metodykę spektrofotometryczną w zakresie UV, chromatografię cienkowarstwową w odwróconym układzie faz oraz metody elektrochromatograficzne. Na podstawie dokonanego przeze mnie przeglądu literatury [Farm. Przegl. Nauk. 2008] uznałam, że jedną z możliwych (i niewątpliwie najtańszych) dróg oznaczania zawartości niektórych substancji promieniochronnych może być rzeczywiście spektrofotometria UV/VIS, ale z uwagi na interferencję innych surowców kosmetycznych, absorbujących w zakresie ultrafioletowym, uznałam za zasadne wykonywanie oznaczeń w zakresie widzialnym po uprzedniej derywatywacji analitu; zaproponowaną przeze mnie metodę derywatywacji poprzez przeprowadzenie w barwne połączenia kompleksowe z kationami, w szczególności  $UO_2^{2+}$ ,  $VO^{2+}$  i  $Fe^{3+}$  przedstawiłam w publikacji oryginalnej [Pol. J. Cosmetol. 2007] na przykładzie AVO (Avobenzone, INCI: Butyl Methoxydibenzoylmethane).

Na następnym etapie moich prac, związanych z poszukiwaniem nowych metod analitycznych oznaczania substancji promieniochronnych, zwróciłam uwagę w kierunku chromatografii cienkowarstwowej. Możliwa już w owym czasie densytometryczna ocena uzyskiwanych chromatogramów planarnych, obok rzadziej stosowanej wideodensytometrii, ogromnie przyspieszyła rozwój zastosowań chromatografii cienkowarstwowej w dziedzinie analizy ilościowej, wypierając stosowane wcześniej, zawodne i pracochłonne metody ilościowej interpretacji chromatogramów planarnych, polegające na pomiarze pola powierzchni plamki lub ekstrakcji analitu z plamki i oznaczaniu jego zawartości przy pomocy innych technik analitycznych.

Przedstawione w literaturze przez Shermę i współp. metody oznaczania zawartości filtrów UV, przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i densytometrii, oparte zostały na wykorzystaniu rozdziału chromatograficznego w odwróconym układzie faz, na fazie stacjonarnej RP-18. Tego rodzaju podejście do doboru techniki chromatograficznej było prawdopodobnie związane z ogromnym rozpowszechnieniem w analityce surowców kosmetycznych chromatografii HPLC w odwróconym układzie faz, zwłaszcza na kolumnach z tym samym wypełnieniem – RP-18.

Z wykonanych przeze mnie systematycznych badań retencji substancji promieniochronnych na fazach stacjonarnych RP-18, RP-2 oraz na żelu krzemionkowym 60 przy użyciu faz ruchomych o różnych składach wywnioskowałam, że rozdział, a następnie

oznaczanie zawartości tego rodzaju analitów mogą być skutecznie przeprowadzane przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej na znacznie mniej kosztownym żelu krzemionkowym 60. Żel krzemionkowy, w połączeniu z odpowiednio dobraną fazą ruchomą, pozwala też rozdzielić substancje, których rozdział przy pomocy chromatografii w odwróconym układzie faz jest kłopotliwy. Wyniki dokonanego przeze mnie przeglądu rozdziału substancji promieniochronnych przy pomocy kilkudziesięciu różnych układów chromatograficznych przedstawiłam w pracy oryginalnej [*Acta Pol. Pharm.* **2012**], a praktyczne zastosowanie wyciągniętych przeze mnie wówczas wniosków zaowocowało opracowaniem szeregu nowatorskich metod analitycznych, pozwalających na oznaczanie ilościowe stosunkowo złożonych mieszanin substancji promieniochronnych w obecności innych surowców kosmetycznych, np. konserwantów, substancji zapachowych, emulgatorów. Z uwagi na wspomnianą wcześniej tendencję do stosowania w preparatach kosmetycznych mieszanin substancji promieniochronnych o zróżnicowanych właściwościach fizykochemicznych (w recepturach emulsyjnych stosować można zarówno filtry rozpuszczalne w fazie tłuszczowej, jak i wodnorozpuszczalne; do preparatów detergentowych wprowadza się z reguły te drugie) i co za tym idzie o zróżnicowanej retencji, dobór odpowiedniej fazy ruchomej do chromatografii cienkowarstwowej nie jest zadaniem łatwym. Opracowanie uniwersalnych warunków rozdziału chromatograficznego, odpowiednich dla wszelkich możliwych kombinacji filtrów UV oraz współwystępujących z nimi konserwantów i innych surowców wydaje się mało realistyczne. Zaproponowałam zatem kilka użytecznych wariantów, skutecznych w przypadku analizy mieszanin substancji promieniochronnych o różnych składach, występujących w typowych recepturach.

Prosty układ chromatograficzny – żel krzemionkowy 60 i eluent o składzie eter dietylowy - cykloheksan 5:1 (v/v) posłużył mi za punkt wyjścia do oznaczenia densytometrycznego PABA (kwasu *p*-aminobenzoesowego) w preparatach farmaceutycznych (z uwagi na niezbyt dobrą opinię, jaką cieszy się PABA jako składnik receptur kosmetyków promieniochronnych, substancja ta jest współcześnie stosowana głównie jako składnik suplementów diety, witamina B10) [*J. Planar Chromatogr.* **2010**]. W celu poprawy selektywności oznaczenia zaproponowałam dwie alternatywne metody detekcji densytometrycznej – spektrofotometrię w zakresie ultrafioletowym (270 nm) lub w zakresie widzialnym (500 nm), po derywatywacji PABA przy pomocy zmodyfikowanej przeze mnie

wersji reakcji barwnej Brattona-Marshalla, wykonanej *in situ* na świeżo uzyskanych chromatogramach cienkowarstwowych.

W toku dalszych prac, poświęconych analityce surowców kosmetycznych, posługując się fazą ruchomą o składzie cykloheksan - eter dietylowy - aceton 15:1:2 (v/v/v), dokonałam rozdziału chromatograficznego, uzupełnionego o zwalidowane oznaczenie densytometryczne, filtrów o znacznej lipofilowości – OMC (*INCI: Ethylhexyl Methoxycinnamate*) i DHHB (*INCI: Diethylamino Hydroxybenzoyl Hexyl Benzoate*) [*J. Planar Chromatogr.* **2011**]. Podobna faza ruchoma (cykloheksan - eter dietylowy - aceton 15:1:2 v/v/v) posłużyła mi do rozdziału i oznaczenia ilościowego OMC, DHHB, ET (*INCI: Ethylhexyl Triazone*) i parabenów w ramach jednej procedury [*Sci. World J.* **2012**].

Zastosowane przeze mnie [*J. Planar Chromatogr.* **2011**, *Sci. World J.* **2012**] układy chromatograficzne nie sprawdziły się w przypadku rozdziału innej mieszaniny substancji promieniochronnych o charakterze lipofilowym – AVO, OCR (*INCI: Octocrylene*) i ET. AVO i OCR charakteryzują się na tyle podobnymi właściwościami fizykochemicznymi, determinującymi retencję, że zastosowane przeze mnie „klasyczne” fazy ruchome (cykloheksan - eter dietylowy - izopropanol; cykloheksan - eter dietylowy - octan etylu; cykloheksan - eter dietylowy; cykloheksan - eter dietylowy - aceton; cykloheksan - izopropanol; cykloheksan - octan etylu; cykloheksan - chloroform; toluen; toluen - octan etylu; toluen - octan etylu - kwas octowy; cykloheksan - eter dietylowy – izopropanol - octan etylu) zawiodły, nie pozwalając na skuteczny rozdział AVO i OCR, pozostawiając ET na linii startowej chromatogramów, albo z obu tych powodów jednocześnie. Nie powiodły się także liczne próby rozdziału omawianej mieszaniny przy pomocy chromatografii w odwróconym układzie faz – przyczyną niepowodzeń w tym przypadku okazała się znaczna lipofilowość ET i jego wysokie powinowactwo do fazy stacjonarnej. Pokładane w niej nadzieje spełniła dopiero chromatografia w normalnym układzie faz z dodatkiem nietypowego modyfikatora – piperydyny (cykloheksan - piperydyna 5:1 v/v), która w znaczącym stopniu zmodyfikowała retencję AVO (spowodowała zahamowanie jego migracji) i jednocześnie ET (działanie odwrotne), tym samym umożliwiając rozdział i współoznaczenie densytometryczne mieszaniny trzech wymienionych filtrów z doskonałą skutecznością [*J. Planar Chromatogr.* **2012**].

W trakcie pracy, poświęconej metodyce rozdziału i oznaczania surowców kosmetycznych przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej postanowiłam również

zmierzyć się z problematyką analizy surowców wodnorozpuszczalnych – hydrofilowych, często występujących w recepturach w postaci zjonizowanej. Substancje te to m.in. filtry UV, przeznaczone głównie do wyrobów detergentowych i perfumeryjnych, np. BZ-4 (*INCI: Benzophenone-4*), PBS (*INCI: Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid*), czy niektóre barwniki syntetyczne. Chromatografia tego rodzaju analitów w odwróconym układzie faz (RP-18) nie jest zadaniem łatwym z uwagi na ich znaczne powinowactwo do fazy ruchomej i skłonność do migrowania z czołem rozpuszczalnika, natomiast chromatografia w normalnym układzie faz na żelu krzemionkowym 60 z zastosowaniem eluentów takich, jak wspomniane powyżej w kontekście analityki substancji lipofilowych skutkuje pozostawieniem substancji na linii startowej chromatogramów. Chromatografia na fazie stacjonarnej RP-2 daje wyniki negatywne, zależne od charakteru zastosowanej fazy ruchomej – migrację substancji z czołem rozpuszczalnika lub jej pozostawienie na linii startowej. W przypadku substancji o budowie kwasowej (jak np. BZ-4 lub PBS, niektóre barwniki syntetyczne) za typowe postępowanie należałoby uznać zastosowanie chromatografii par jonowych na sorbentach typu anionowymiennego, ja natomiast postanowiłam posłużyć się metodyką z zakresu chromatografii oddziaływań hydrofilowych (HILIC). W chromatografii HILIC stosowane są polarne fazy stacjonarne, typowe dla chromatografii w normalnym układzie faz (żel krzemionkowy oraz krzemionka modyfikowana np. grupami  $-NH_2$ ,  $-R(OH)_2$  lub  $-CN$ ), oraz elenty w postaci mieszanin wody z rozpuszczalnikami organicznymi. Mechanizm rozdziału chromatograficznego w chromatografii HILIC ma charakter złożony. Podczas procesu chromatograficznego na powierzchni sorbentu wytwarzana jest hydrofilowa warstwa wodna a analit ulega podziałowi między tę warstwę, a resztę eluentu. Ponadto analit może oddziaływać bezpośrednio z fazą stacjonarną na zasadzie adsorpcji, a sorbent może tworzyć zarówno wiązania wodorowe z analitem, jak i wchodzić z nim w interakcje typu dipol-dipol.

Wykorzystując chromatografię HILIC z żelem krzemionkowym 60 w charakterze fazy stacjonarnej, opracowałam nowe metody oznaczania zawartości substancji promieniochronnej PBS w preparatach kosmetycznych i próbkach środowiskowych (woda) [*Centr. Eur. J. Chem.* **2013**] oraz BZ-4 w preparatach detergentowych (szamponach do włosów) [*J. Anal. Meth. Chem.* **2015**]. W przypadku oznaczania zawartości BZ-4 zastosowałam fazę ruchomą octan etylu – etanol – woda - bufor fosforanowy pH 6 (15:7:5:1 v/v/v/v). Opracowując metodę oznaczania zawartości PBS posłużyłam się natomiast fazą ruchomą octan etylu - etanol - woda (70:35:30 v/v/v) i, dodatkowo, wykorzystałam zdolność

analitu do emisji promieniowania w wyniku fluorescencji, co umożliwiło mi przeprowadzenie analizy densytometrycznej z detekcją fluorescencyjną i znaczne obniżenie poziomu oznaczalności substancji bez konieczności jej wstępnego zateżnienia.

Za swego rodzaju ukoronowanie moich dotychczasowych prac, dotyczących analizy ilościowej filtrów UV uważam zaproponowaną przeze mnie metodę oznaczania zawartości złożonych mieszanin substancji promieniochronnych rozpuszczalnych w wodzie obok substancji rozpuszczalnych w tłuszczach [*J. Planar Chromatogr.* **2012**], przy pomocy połączenia chromatografii cienkowarstwowej w normalnym układzie faz i chromatografii HILIC. Opracowana przeze mnie procedura analityczna, wykorzystująca żel krzemionkowy 60 w charakterze fazy stacjonarnej, polegała na dwukrotnym rozwinięciu chromatogramu – przy pomocy fazy ruchomej cykloheksan - eter dietylowy 5:1 (v/v) – na tym etapie postępowania możliwe były rozdział i oznaczenie densytometryczne analitów o charakterze lipofilowym, np. AVO i OS (*INCI: Ethylhexyl Salicylate*), a następnie z zastosowaniem eluentu octan etylu – etanol - woda 70:35:30 (v/v/v), odpowiedniego dla substancji o charakterze hydrofilowym (np. PBS).

Wspomniana wcześniej strategia rozdziału substancji zjonizowanych, z wykorzystaniem oddziaływań o charakterze par jonowych między sorbentem a analitem, posłużyła mi do opracowania nowej metody wydzielenia i zagęszczania barwników syntetycznych z próbek preparatów farmaceutycznych i napojów, przy pomocy ekstrakcji do fazy stałej (SPE). Zastosowany do ekstrakcji SPE sorbent aminopropyłowy ( $\text{NH}_2$ ) ma charakter słabego anionitu (WAX) o  $\text{pK}_a \approx 9,8$ . Zaadsorbowane na powierzchni zjonizowanej fazy stacjonarnej  $\text{NH}_2$  anality o charakterze kwasowym można zdesorbować przy pomocy jednego z trzech sposobów: (i) neutralizacji analitu do pH ok. 2 jednostki poniżej jego  $\text{pK}_a$ ; (ii) neutralizacji zjonizowanych grup aminopropyłowych sorbentu (do pH ok. 2 jednostki powyżej ich  $\text{pK}_a$ ); (iii) dodatku innego anionu, który będzie oddziaływał z sorbentem w sposób konkurencyjny w stosunku do analitu.

Przyjmując za punkt wyjścia strategię (ii) wyizolowałam barwniki syntetyczne o charakterze kwasów sulfonowych (czerwień koszenilową E124, błękit brylantowy E133, azorubinę E122, żółcień pomarańczową E110, żółcień chinolinową E104, tartrazynę E102 i indygokarminę E132) z próbek napojów i tabletek i opracowałam metodykę spektroskopowego oznaczenia ich zawartości w zakresie widzialnym [*Acta Innov.* **2018**]. Zaproponowałam również metodykę oznaczania barwników (E102, E124, E133, E122 i

E110), wyizolowanych techniką SPE z napojów oraz preparatów do pielęgnacji jamy ustnej przy pomocy chromatografii cienkowarstwowej i densytometrii na żelu krzemionkowym 60, z zastosowaniem fazy ruchomej chloroform – izopropanol - 25% amoniak 1:3:1 (v/v/v) [*J. Anal. Meth. Chem.* **2017**]. W obu przypadkach, na etapie ekstrakcji SPE, stosowałam w charakterze eluentów roztwory o charakterze zasadowym (NaOH lub roztwory amin, rozpuszczalnych w wodzie – imidazolu, morfoliny lub trietanolaminy). Dość szczegółowa analiza warunków procesu SPE dokonana dla omawianych barwników [*Acta Innov.* **2018**] pozwoliła mi wywnioskować, że roztwory wodne badanych amin zapewniają warunki wymywania barwników z sorbentu SPE łagodniejsze, niż NaOH, umożliwiają także pewną selektywność już na etapie desorpcji analitów z fazy stałej. Mechanizm desorpcji badanych barwników przy pomocy amin wydaje się być oparty raczej na konkurencyjnym działaniu grup  $-NH_2$  sorbentu i eluentu w procesie tworzenia par jonowych z grupami sulfonowymi analitu, niż na zobojętnieniu protonowanych grup  $-NH_2$  sorbentu.

Moje zainteresowania naukowe, oprócz analizy preparatów kosmetycznych i farmaceutycznych, metodami z zakresu chromatografii cienkowarstwowej i spektrofotometrii UV/VIS, obejmują również analizę preparatów farmaceutycznych (tabletek) technikami nieniszczącymi, ze szczególnym uwzględnieniem spektroskopii w zakresie bliskiej podczerwieni (NIR). W roku 2009 opracowałam nową metodę ilościowego oznaczania nifuroksazydu w preparatach farmaceutycznych przy pomocy spektroskopii NIR w trybie odbicia [*Chem. Anal.* **2009**]. W analizie wykorzystałam wartości drugiej pochodnej refleksyjności dla serii próbek kalibracyjnych i próbek badanych przy wybranych długościach fal  $i$ , alternatywnie, wartości głównych składowych ( $PC_1$ ), otrzymanych dla widm próbek wzorcowych i badanych. W odróżnieniu od innych, znanych ówczesznie procedur analitycznych dla preparatów w postaci tabletek, w prezentowanej metodzie posłużyłam się skrobią jako prostym modelem masy tabletkowej, zaś długości fal, uwzględniane w analizie, dobrałam w taki sposób, aby dla tych długości fal druga pochodna refleksyjności dla nifuroksazydu była jak największa, natomiast dla skrobi znikoma. Proponując takie rozwiązanie uniknęłam kłopotliwej konieczności pozyskiwania matrycy odpowiedniej dla każdego rodzaju preparatu. Poszukiwania odpowiednich dla danego typu tabletek farmaceutycznych zastępników masy tabletkowej (uwzględniające m.in. poliwinylpirolidon, celulozę mikrokrystaliczną i laktozę), jak również optymalnego sposobu obróbki widm zaowocowały opublikowaniem dwóch dalszych prac z zakresu spektroskopii NIR,

dotyczących oznaczania zawartości metforminy [*J. Appl. Spectr.* **2017**] i pirydoksyny [*Curr. Pharm. Anal.* **2018**], których jestem współautorką.

Odrębną dziedziną moich zainteresowań stały się badania nad różnymi aspektami aktywności biologicznej leku, w szczególności nad zależnością między strukturą cząsteczki a aktywnością biologiczną substancji (QSAR). Jestem współautorką publikacji oryginalnej, dotyczącej badań QSAR grupy pochodnych tiazolowych o aktywności H1-antyhistaminowej [*Acta Pol. Pharm.* **2011**] oraz prac przeglądowych, omawiających mechanizmy wiązania leków z białkami i metody badania tego zjawiska [*Curr. Pharm. Des.* **2018**] oraz zastosowanie chromatografii cieczowej z micelnymi fazami ruchomymi do badania właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej związków [*J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2019**].

W latach 2010–2013 prowadziłam, wspólnie z ówczesną doktorantką Zakładu Stomatologii Wieku Rozwojowego UM w Łodzi Panią Dr Kamilą Haus, szeroko zakrojone badania właściwości śliny dzieci, cierpiących na refluks żołądkowo-przełykowy. Wykonane przeze mnie oznaczenia obejmowały pomiary pehametryczne oraz oznaczanie zawartości kluczowych jonów nieorganicznych metodami spektroskopii UV/VIS oraz fotometrii płomieniowej. Wyniki naszych badań zostały ogłoszone w postaci 2 komunikatów konferencyjnych.

#### **5.4. Działalność dydaktyczna, organizacyjna i pozostałe osiągnięcia**

Pracę dydaktyczną rozpoczęłam podczas studiów doktoranckich na Uniwersytecie w Oksfordzie, prowadząc w latach 1993-1995 zajęcia laboratoryjne z chemii organicznej i metod spektroskopowych dla studentów studiów chemicznych I stopnia.

W ramach moich obowiązków dydaktycznych, w Zakładzie Chemii Analitycznej prowadzę zajęcia laboratoryjne, seminaria i wykłady z przedmiotów:

- Chemia analityczna (II rok kierunku analityka medyczna)
- Chemia analityczna (II rok kierunku farmacja)
- Analiza instrumentalna (II rok kierunku analityka medyczna)
- Metodologia badań analitycznych kosmetyku (I rok kosmetologii studiów II stopnia).

Jestem współautorką skryptu dla studentów I roku studiów II stopnia kosmetologii „Metodologia badań analitycznych kosmetyku” (Wydawnictwo UMED, Łódź 2008), autorką programu nauczania przedmiotu fakultatywnego „Analiza przemysłowa” (2005) oraz

współautorką programu nauczania i materiałów dydaktycznych do przedmiotu fakultatywnego „Zapewnienie i kontrola jakości badań w laboratorium analitycznym” (2014), prowadziłam również zajęcia seminaryjne z dwóch wymienionych przedmiotów fakultatywnych.

Sprawuję opiekę nad pracami magisterskimi na kierunkach farmacja i kosmetologia oraz pracami dyplomowymi na kierunku kosmetologia (studia I stopnia). Dotychczas byłam opiekunem 10 prac magisterskich na kierunku farmacja i 4 na kierunku kosmetologia oraz 2 prac dyplomowych na kierunku kosmetologia. Byłam także opiekunem 1 pracy magisterskiej, wykonanej w ramach współpracy z Uniwersytetem Łódzkim przez studentkę Wydziału Chemii UŁ (kierunek analityka chemiczna).

Obecnie jestem promotorem pomocniczym 1 pracy doktorskiej.

Jestem opiekunem Koła Naukowego przy Zakładzie Chemii Analitycznej. Tematyka prac Koła obejmuje zagadnienia z zakresu zastosowania chromatografii cienkowarstwowej oraz spektroskopii UV/VIS do oznaczeń ilościowych oraz badania właściwości fizykochemicznych i aktywności biologicznej substancji. Studenci, biorący udział w pracach Koła, są jak dotychczas współautorami jednej pracy oryginalnej [*Acta Innov.* **2018**] oraz 2 komunikatów konferencyjnych.

Systematycznie poszerzam moją wiedzę zawodową, uczestnicząc w licznych szkoleniach i kursach specjalistycznych, m.in.:

- 'Introduction to design of experiments' – Szczyrk 2018
- „Otwarty UMED” – szkolenie nt. publikowania w systemie Open Access, Łódź 2018
- „Warsztaty z zasad stosowania metrologii w pomiarach chemicznych”, Poznań 2017
- „Elektrochemiczna symulacja metabolizmu selegininy. Analiza UHPLC-MS/MS metabolitów selegininy” - warsztaty firmy Shim-Pol, Szczyrk 2016
- „Technika GC-MS/MS – luksus czy konieczność” - seminarium Shim-Pol, Łódź 2013
- Seminarium nt. detekcji i identyfikacji niebezpiecznych substancji, w tym narkotyków i materiałów wybuchowych - IRtech – Raytech, 2014
- „Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) do izolacji analitów z żywności i matrycy środowiskowych” - warsztaty Bioanalytic, Gdańsk 2012
- „Zastosowanie ekstrakcji do fazy stałej (SPE) do izolacji substancji psychoaktywnych z płynów biologicznych” - warsztaty Bioanalytic, Gdańsk 2012



- IV Konferencja „Analityczne zastosowania chromatografii cieczowej”, Warszawa 2009
- „Technologia w służbie społeczeństwu. Nowe oblicze spektroskopii mas LC-MS/MS” - warsztaty Shim-Pol, Łódź 2014
- Seminarium „Badanie i ocena materiałów farmaceutycznych metodami analizy termicznej, kalorymetrii i technikami sorpcyjnymi” oraz „Praktyczna szkoła opracowywania metod NIR” – warsztaty Spectro-Lab i TA Instruments, Warszawa 2007
- „Spektroskopia podczerwieni w rutynowych badaniach laboratoryjnych” - warsztaty Perkin-Elmer, Warszawa 2012
- „Jak interpretować prawo autorskie na uczelni” - Warszawa, 2014

Wzięłam także udział w kilku szkoleniach, mających na celu podniesienie moich kwalifikacji dydaktycznych: projekcie „Ready to teach” (Łódź 2018-2019), szkoleniu „Student z zaburzeniami psychicznymi – zrozumienie i wsparcie w procesie dydaktycznym” (Łódź 2019) oraz kursie dydaktycznym „Metodyka nauczania w naukach biomedycznych” (Łódź 2016-2017).

Biorę aktywny udział w międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych. Jestem współautorką 28 doniesień zjazdowych, w tym 3 zagranicznych.

Jestem zapraszana przez czasopisma naukowe do przygotowywania recenzji artykułów. Recenzowałam 24 manuskrypty dla czasopism o zasięgu międzynarodowym, w większości znajdujących się w bazie JCR, w tym 6 dla czasopisma *Open Chemistry* (poprzednia nazwa *Central European Journal of Chemistry*), 4 dla *Journal of Chromatography and Separation Technique*, 5 dla *Journal of Analytical and Bioanalytical Techniques*, 1 dla *Journal of Separation Science*, 1 dla *Biomedical Chromatography*, 2 dla *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 1 dla *European Journal of Medicinal Chemistry* i 1 dla *Current Analytical Chemistry*.

W roku 2017 podjęłam jako recenzent stałą współpracę z czasopismem *Acta Innovations*. Jestem członkiem komitetów redakcyjnych czasopism *Science Journal of Analytical Chemistry* oraz *Organic and Medicinal Chemistry International Journal*.

Trzy z moich publikacji [*J. Planar Chromatogr.* **2016**, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* **2018** and **2019**] powstały w odpowiedzi na zaproszenia do współpracy przy powstaniu recenzowanych numerów specjalnych czasopism.

Za działalność naukową otrzymałam 5 zespołowych Nagród Rektora Uniwersytetu Medycznego w Łodzi.

Szczegółowe informacje o osiągnięciach naukowo-badawczych zamieszczam w Załączniku 4 (Wykaz opublikowanych prac naukowych lub twórczych prac zawodowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki).

## Literatura

1. Yang, C.Y.; Cai, S.J.; Liu, H.; Pidgeon, C. Immobilized Artificial Membranes – screens for drug membrane interactions. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1996**, *23*, 229-256
2. Meyer, H. Zur Theorie der Alkoholnarkose. Welche Eigenschaft der Anaesthetica bedingt ihre narkotische Wirkung? *Arch. Exp. Path. Pharm.* **1899**, *42*, 109-118
3. Hansch, C.; Dunn, W.J. Linear Relationships between Lipophilic Character and Biological Activity of Drugs. *J. Pharm. Sci.* **1972**, *61*, 1-19
4. Hansch, C.; Steward, A.R.; Anderson, S.M.; Bentley, D.L. Parabolic dependence of drug action upon lipophilic character as revealed by a study of hypnotics. *J. Med. Chem.* **1968**, *11*, 1-11
5. Berthold, A.; Carda-Broch, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 3-14
6. Hartmann, T.; Schmitt, J. Lipophilicity – beyond octanol/water: a short comparison of modern technologies. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, *1*, 431-439
7. Wicha-Komsta, K.; Komsta, L. Unconventional TLC systems in lipophilicity determination: A review. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2017**, *40*, 219-225
8. Gowin, E.; Komsta, L. Revisiting Thin-Layer Chromatography as a Lipophilicity Determination Tool. Part II – Is Silica Gel a Reliable Adsorbent for Lipophilicity Estimation. *J. Planar Chromatogr.* **2012**, *25*, 5-9
9. Bate-Smith, E.C.; Westall, R.G. Chromatographic behaviour and chemical structure I. Some naturally occurring phenolic substances. *Biochem. Biophys. Acta* **1950**, *4*, 427-440
10. Soczewiński, E.; Wachtmeister, C.A. The relation between the composition of certain ternary two-phase solvent systems and  $R_m$  values. *J. Chromatogr.* **1962**, *7*, 311-320
11. Soczewiński, E. Solvent Composition Effects in Thin Layer Chromatography Systems of the Type Silica Gel-Electron Donor Solvent. *Anal. Chem.* **1969**, *41*, 179-182

12. Flieger, J.; Tatarczak, M. Effect of Inorganic Salts as Mobile-Phase Additives on Lipophilicity Values Determined by Reversed-Phase Thin-Layer Chromatography for New 1,2,4-Triazole Derivatives. *J. Planar Chromatogr.* **2006**, *19*, 386-392
13. Janicka, M.; Ościk-Mendyk, B.; Tarasiuk, B. Planar Chromatography in Studies of the Hydrophobic Properties of Some New Herbicides. *J. Planar. Chromatogr.* **2004**, *17*, 186-191
14. Komsta, Ł.; Skibiński, R.; Berecka, A.; Gumieniczek, A.; Radkiewicz, B.; Radoń, M. Revisiting thin-layer chromatography as a lipophilicity determination tool - A comparative study on several techniques with a model solute set. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *53*, 911-918
15. Norinder, U.; Haberlein, M. Computational approaches to the prediction of the blood-brain distribution. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, 291-313
16. Giokas, D.L.; Salvador, A.; Chisvert, A. UV filters: From sunscreens to human body and the environment. *Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 360-374
17. Diaz-Cruz, M.S.; Llorca, M.; Barcelo, D. Organic UV filters and their photodegradates, metabolites and disinfection by-products in the aquatic environment. *Trends Anal. Chem.* **2008**, *27*, 873-887
18. Casoni, D.; Sarbu, C. Comprehensive evaluation of lipophilicity of biogenic amines and related compounds using different chemically bonded phases and various descriptors. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35*, 915-921
19. Casoni, D.; Sarbu, C. The lipophilicity of parabens estimated on reverse phases chemically bonded and oil-impregnated plates and calculated using different computation methods. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 2377-2384
20. Casoni, D.; Sarbu, C. Lipophilicity of some preservatives estimated by RP-TLC using stationary phases with different polarity. *Chromatographia* **2009**, *70*, 1277-1282
21. Angelov, T.; Vlasenko, A.; Tashkov, W. HPLC determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters. *J. Liquid. Chromatogr. Rel. Technol.* **2008**, *31*, 188-197
22. [www.vccl.com](http://www.vccl.com)
23. STATISTICA V. 10.0 StatSoft Poland, 2011

24. Giaginis, C.; Tsantili-Kakoulidou, A. RPTLC Retention Indices of Basic and Neutral Drugs as Surrogates of Octanol-Water Distribution Coefficients. Effect of Buffer Constituents and pH. *J. Planar. Chromatogr.* **2009**, 22, 217-224.
25. Sarbu, C.; Todor, S. Evaluation of lipophilicity by principal components analysis. *J. Planar Chromatogr.* **1998**, 11, 123-126
26. Cardoso, F.L.; Brites, D.; Brito, M.A. Looking at the blood-brain barrier: molecular anatomy and possible investigation approaches. *Brain Res. Rev.* **2010**, 64, 328-363
27. Pardridge, W.M. The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx* **2005**, 2, 3-14
28. Bicker, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Falcao, A. Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: A review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2014**, 87, 409-432
29. Abbot, N.J. Prediction of blood-brain barrier permeation in drug discovery from *in vivo*, *in vitro* and *in silico* models. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, 1, 407-416
30. Dash, A.K.; Elmquist, W.F. Separation methods that are capable of revealing blood-brain barrier permeability. *J. Chromatogr. B* **2003**, 797, 241-254
31. Goodwin, J.T.; Clark, D.E. In Silico Predictions of Blood-Brain Barrier Penetration: Considerations to „Keep in Mind”. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* **2005**, 315, 477-483
32. Kaznessis, Y.N. A Review of Methods for Computational Prediction of Blood-Brain Partitioning. *Curr. Med. Chem. – Centr. Nerv. Syst. Agents* **2005**, 5, 185-191
33. Pardridge, W.M. Log(BB), PS products and *in silico* models of drug brain penetration. *Drug Discov. Today* **2004**, 9, 392-393
34. Zhao, Y.H.; Abraham, M.H.; Ibrahim, A.; Fish, P.V.; Cole, S.; Lewis, M.L.; de Groot, M.J.; Reynolds, D.P. Predicting Penetration Across the Blood-Brain Barrier from Simple Descriptors and Fragmentation Schemes. *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, 47, 170-175
35. Dischino, D.D.; Welch, M.J.; Kilbourn, M.R.; Raichle, M.E. Relationship Between Lipophilicity and Brain Extraction of C-11-Lebeled Radiopharmaceuticals. *J. Nucl. Med.* **1983**, 24, 1030-1038
36. Vranka, C.; Nics, L.; Wagner, K.H.; Hacker, M.; Wadsak, W.; Mitterhauser, M. LogP, a yesterday's value? *Nucl. Med. Biol.* **2017**, 50, 1-10

37. Clark, D.E. In silico prediction of blood-brain barrier permeation. *Drug Discov. Today* **2003**, 8, 927-933
38. Ooms, F.; Weber, P.; Carrupt, P.A.; Testa, B. A simple model to predict blood-brain barrier permeation from 3D molecular fields. *Biochem. Biophys. Acta* **2002**, 1587, 118-125
39. Doan, K.M.; Humphreys, J.E.; Webster, L.O.; Wring, S.A.; Shampine, L.J.; Serabjit-Singh, C.J. *et al.* Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2002**, 303, 1029-1037
40. Pajouhesh, H.; Lenz, G.R. Medicinal Chemical Properties of Successful Central Nervous System Drugs. *NeuroRx* **2005**, 2, 541-553
41. Geldenhuys, W.J.; Mohammad, A.S.; Adkins, C.E.; Lockman, P.R. Molecular determinants of blood-brain barrier permeation. *Ther. Deliv.* **2015**, 6, 961-971
42. Adenot, M.; Lahana, R. Blood-brain barrier permeation models: Discriminating between potential CNS and non-CNS drugs including P-glycoprotein substrates. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2004**, 44, 239-248
43. Kelder, J.; Grootenhuis, P.D.J.; Bayada, D.M.; Delbressine, L.P.C.; Ploemen, J.P. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm. Res.* **1999**, 16, 1514-1519
44. Liu, J.; Sun, J.; Sui, X.; Wang, Y.; Hou, Y.; He, Z. Predicting blood-brain barrier penetration of drugs by microemulsion liquid chromatography with corrected retention factor. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1198-1199, 164-172
45. Subirats, X.; Munoz-Pascual, L.; Abraham, M.H.; Roses, M. Revisiting blood-brain barrier: A chromatographic approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 145, 98-109
46. Farsa, O. Chromatographic behavior predicts the ability of potential nootropics to permeate the blood-brain barrier. *Scientia Pharm.* **2013**, 81, 81-91
47. Ciura, K.; Dziomba, S.; Nowakowska, J.; Markuszewski, M.J. Thin layer chromatography in drug discovery process. *J. Chromatogr. A* **2017**, 1520, 9-22
48. Ciura, K.; Belka, M.; Kawczak, P.; Bączek, T.; Markuszewski, M.J.; Nowakowska, J. Combined computational-experimental approach to predict blood-brain barrier (BBB) permeation based on “green” salting-out thin layer chromatography supported by simple molecular descriptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, 143, 214-221

49. Nikolic, K.; Filipic, S.; Smoliński, A.; Kaliszan, R.; Agbaba, D. Partial Least Square and Hierarchical Clustering in ADMET Modeling: Prediction of Blood-Brain Barrier Permeation of  $\alpha$ -Adrenergic and Imidazoline Receptor Ligands. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2013**, 16, 622-647
50. Gulyaeva, N.; Zaslavsky, A.; Lechner, P.; Chlenov, M.; McConnel, O.; Chait, A.; Kipnis, V.; Zaslavsky, B. Relative hydrophobicity and lipophilicity of drugs measured by aqueous two-phase partitioning, octanol-buffer partitioning and HPLC. A simple model for predicting blood-brain distribution. *Eur. J. Med. Chem.* **2003**, 38, 391-296
51. Stępnik, K.E.; Malinowska, I. The use of biopartitioning micellar chromatography and immobilized artificial membrane column for *in silico* and *in vitro* determination of blood-brain barrier penetration of phenols. *J. Chromatogr. A* **2013**, 1286, 127-136
52. De Vrieze, M.; Lynen, F.; Chen, K.; Szucs, R.; Sandra, P. Predicting drug penetration across the blood-brain barrier: comparison of micellar liquid chromatography and immobilized artificial membrane liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, 405, 6029-6041
53. Reiche, A.; Begley, D.J. Potential of immobilized artificial membranes for predicting drug penetration across the blood-brain barrier. *Pharm. Res.* **1998**, 15, 1270-1274
54. Yoon, C.H.; Kim, S.J.; Shin, B.S.; Lee, K.C.; Yoo, S.D. Rapid screening of blood-brain barrier penetration of drugs using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography. *J. Biomol. Screen.* **2006**, 11, 13-20
55. Salminen, T.; Pulli, A.; Taskinen, J. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and the drug penetration of structurally diverse drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1997**, 15, 469-477
56. Ducarme, A.; Neuwels, M.; Goldstein S, Massingham R. IAM retention and blood brain barrier penetration. *Eur. J. Med. Chem.* **1998**, 33, 215-223
57. Karasova, J.Z.; Stodulka, P.; Kuca, K. *In vitro* screening of blood-brain barrier penetration of clinically used acetylcholinesterase reactivity. *J. Appl. Biomed.* **2010**, 8, 35-40
58. Karasova, J.Z.; Jun, D.; Kuca, K. Screening of blood-brain barrier penetration using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column chromatography at the physiological pH. *Mil. Med. Sci. Lett.* **2013**, 82, 55-62

59. Grumetto, L.; Carpentiero, C.; Di Vaio, P.; Frecentese, F.; Barbato, F. Lipophilic and polar interaction forces between acidic drugs and membrane phospholipids encoded in IAM-HPLC indexes: Their role in membrane partition and relationships with BBB permeation data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *75*, 165-172
60. Grumetto, L.; Russo, G.; Barbato, F. Indexes of polar interactions between ionizable drugs and membrane phospholipids measured by IAM-HPLC: Their relationships with data of Blood-Brain Barrier passage. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2014**, *65*, 139-146
61. Grumetto, L.; Carpentiero, C.; Barbato, F. Lipophilic and electrostatic forces encoded in IAM-HPLC indexes of basic drugs: Their role in membrane partition and their relationships with BBB passage data. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2012**, *45*, 685-692
62. Grumetto, L.; Russo, G.; Barbato, F. Immobilized artificial membrane HPLC derived parameters vs PAMPA-BBB in estimating *in situ* measured blood-brain barrier permeation of drugs. *Mol. Pharm.* **2016**, *13*, 2808-2816
63. Abraham, M.H.; Chadha, H.S.; Leitao, R.A.E.; Mitchell, R.C.; Lambert, W.J.; Kalisz, R.; Nasal, A.; Haber, P. Determination of solute lipophilicity, as log P(octanol) and log P(alkane) using poly(styrene-divinylbenzene) and immobilized artificial membrane stationary phases in reversed-phase high performance-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1997**, *766*, 35-47
64. Du C.M.; Valko, K.; Bevan, C.; Reynolds, D.; Abraham, M.H. Rapid gradient RP-HPLC method for lipophilicity determination: A solvation-based comparison with isocratic methods. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4228-4234
65. Valko, K.; Slegel, P. New chromatographic hydrophobicity index ( $\phi_0$ ) based on the slope and the intercept of the log  $k'$  versus organic phase concentration plot. *J. Chromatogr.* **1993**, *631*, 49-61
66. Valko, K.; Du, C.M.; Bevan, C.D.; Reynolds, D.; Abraham, M.H. Rapid-gradient HPLC method for measuring drug interactions with immobilized artificial membrane: comparison with other lipophilicity measures. *J. Pharm. Sci.* **2000**, *89*, 1085-1095
67. Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Bhat, G.; Pidgeon, C. Membrane Partition Coefficient Chromatographically Measured Using Immobilized Artificial Membrane Surfaces. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 755-762
68. Taillardat-Bertschinger, A.; Marca Martinet, C.A.; Carrupt, P.A.; Reist, M.; Caron, G.; Fruttero, R.; Testa, R. Molecular Factors Influencing Retention on Immobilized

- Artificial Membranes (IAM) Compared to Partitioning in Liposomes and *n*-Octanol. *Pharm. Res.* 2002, 19, 729-737
69. Yoon, C.H.; Shin, B.S.; Chang, H.S.; Kwon, L.S.; Kim, H.Y.; Yoo, S.E.; et al: Rapid screening of drug absorption potential using the immobilized artificial membrane phosphatidylcholine column and molar volume. *Chromatographia* **2006**, 60, 399-404
70. Chan, E.C.Y.; Tan, W.L.; Ho, P.C.; Fang, L.J. Modeling Caco-2 permeability of drugs using immobilized artificial membrane chromatography and physico-chemical descriptors. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1072, 159-168
71. Deconinck, E.; Ates, H.; Callebaut, N.; Van Gyseghem, E.; Vander Heyden, Y. Evaluation of chromatographic descriptors for the prediction of gastro-intestinal absorption of drugs. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1138, 190-202
72. Grumetto, L.; Russo, G.; Barbato, F. Polar interactions drug/phospholipids estimated by IAM-HPLC vs cultured cell line passage data: Their relationships and comparison of their effectiveness in predicting drug human intestinal absorption. *Int. J. Pharm.* **2016**, 500, 275-290
73. Kotecha, J.; Shah, S.; Rathod, I.; Subbaiah, G. Relationship between immobilized artificial membrane chromatographic retention and human oral absorption of structural-diverse drugs. *Int. J. Pharm.* **2007**, 333, 127-135
74. Kotecha, J.; Shah, S.; Rathod, I.; Subbaiah, G. Prediction of oral absorption in humans by experimental immobilized artificial membrane chromatography indices and physico-chemical parameters. *Int. J. Pharm.* **2008**, 360, 96-106
75. Palm, K.; Stenberg, P.; Luthman, K.; Artursson, P. Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans. *Pharm. Res.* **1997**, 14, 568-571
76. Yen, T.E.; Agatonovic-Kustrin, S.; Evans, A.M.; Nation, R.L.; Ryand, J. Prediction of drug absorption based on immobilized artificial membrane (IAM) chromatography separation and calculated molecular descriptors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 472-478
77. Grumetto, L.; Russo, G.; Barbato, F. Relationships between human intestinal absorption and polar interactions drug/phospholipids estimated by IAM-HPLC. *Int. J. Pharm.* **2015**, 489, 186-194



78. Hollosy, F.; Valko, K.; Hersey, A.; Nunhuck, S.; Keri, G.; Bevan, C. Estimation of volume of distribution in humans from high throughput HPLC-based measurements of human serum albumin binding and immobilized artificial membrane partitioning. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 6958-6971
79. Valko, K.; Nunhuck, S.B.; Hill, A.P. Estimating unbound volume of distribution and tissue binding by *in vitro* HPLC-based human serum albumin and immobilized artificial membrane-binding measurements. *J. Pharm. Sci.* **2011**, 100, 849-862
80. Kaliszan, R.; Nasal, A.; Buciński, A. Chromatographic hydrophobicity parameter determined on an immobilized artificial membrane column: relationships to standard measures of hydrophobicity and bioactivity. *Eur. J. Med. Chem.* **1994**, 29, 163-170
81. Cimpean, D.M.; Poole, C.F. Systematic search for surrogate chromatographic models of biopartitioning processes. *Analyst* **2002**, 127, 724-729
82. Barbato, F.; Cappello, B.; Miro, A.; La Rotonda, M.I.; Quaglia, F. Chromatographic indexes on immobilized artificial membranes for the prediction of transdermal transport of drugs. *Il Farmaco* **1998**, 53, 655-661
83. Hidalgo-Rodriguez, M.; Soriano-Meseguer, S.; Fuguet, E.; Rafols, C.; Roses, M. Evaluation of the suitability of chromatographic systems to predict human skin permeation of neutral compounds. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2013**, 50, 557-568
84. Lazaro, E.; Rafols, C.; Abraham, M.H.; Roses, M. Chromatographic estimation of drug disposition properties by means of immobilized artificial membranes (IAM) and C18 columns. *J. Med. Chem.* **2006**, 49, 4861-4870
85. Nasal, A.; Sznitowska, M.; Buciński, A.; Kaliszan, R. Hydrophobicity parameter from high performance liquid chromatography on an immobilized artificial membrane column and its relationship to bioactivity. *J. Chromatogr. A* **1995**, 692, 83-89
86. Valko, K.; Nunhuck, S.; Bevan, C.; Abraham, M.H.; Reynolds, D.P. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin. Relationships with octanol/water and immobilized artificial membrane lipophilicity. *J. Pharm. Sci.* **2003**, 92: 2236-2248.
87. Verzele, D.; Lynen, F.; De Vrieze, M.; Wright, A.G.; Hanna-Brown, M.; Sandra, P. Development of the first sphingomyelin biomimetic stationary phase for immobilized artificial membrane (IAM) chromatography. *Chem. Commun.* **2012**, 48, 1162-1164

88. De Vrieze M, Vriezele D, Szucs R, Sandra P, Lynen F. Evaluation of sphingomyelin, cholesterol, and phosphatidylcholine-based immobilized artificial membrane liquid chromatography to predict drug penetration across the blood-brain barrier. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 6179-6188
89. Fan, Y.; Unwalla, R.; Denny, R.A.; Di, L.; Kerns, E.H.; Diller, D.J.; Humblet, C. Insights for predicting blood-brain barrier penetration of CNS targeted molecules using QSPR approaches. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, 50, 1123-1133
90. Van de Waterbeemd, W.H.; Camenisch, G.; Folkers, G.; Chretien, J.R.; Rayevsky, O. Estimation of blood-brain barrier crossing of drugs using molecular size and shape, and H-bonding descriptors. *J. Drug Target.* **1998**, 6, 151-165
91. Kaliszan, R.; Markuszewski, M. Blood/brain distribution described by a combination of partition coefficient and molecular mass. *Int. J. Pharm.* **1996**, 145, 9-16
92. Clark, D.E. Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and Its Application to the Prediction of Transport Phenomena. 2. Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration. *J. Pharm Sci.* **1999**, 88, 815-821
93. Vilar, S.; Chakrabarti, M.; Constanzi, S. Prediction of passive blood-brain partitioning: straightforward and effective classification models based on in silico derived physicochemical descriptors. *J. Mol. Graph. Model.* **2010**, 28, 899-903
94. Drugbank: <https://www.drugbank.ca/>, Edmonton, Canada, 2018
95. HyperChem for Windows release 7.02, HyperCube Inc., Gainesville, FL, USA, 2002
96. ACD/Labs™ Log D Suite 8.0, pKa dB 7.0, Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada 2004
97. Nakata, H.; Murata, S.; Shinohara, R.; Filatreau, J.; Isobe, T.; Takahashi, S.; Tanabe, S. Occurrence and Concentrations of Persistent Personal Care Products, Organic UV Filters, in the Marine Environment. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry – Environmental Research in Asia*, Red.: Y. Obayashi, T. Isobe, A. Subramanian, S. Suzuki. S. Tanabe. Terrapub, Tokyo, **2009** pp. 239-246
98. Fent, K.; Kunz, P.Y.; Gomez, E. UV Filters in the Aquatic Environment Induce Hormonal Effects and Affect Fertility and Reproduction in Fish. *Chimia* **2008**, 62, 368-375
99. A. Balaguer, A. Chisvert, A. Salvador, Sequential-injection determination of traces of disodium phenyl dibenzimidazole tetrasulfonate in urine from users of sunscreens by

- on-line solid-phase extraction coupled with a fluorimetric detector. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **40** (2006) 922–927
100. Balaguer, A.; Chisvert, A.; Salvador, A.; Herraez, M.; Diez, O. A solid-phase extraction and size-exclusion liquid chromatographic method for polyethylene glycol 25 p-aminobenzoic acid determination in urine: Validation for urinary excretion studies of users of sunscreens. *Anal. Chim. Acta* **2008**, 611, 220–225
101. Wang, L.-H.; Huang, W.-S.; Tai, H.-M. Simultaneous determination of p-aminobenzoic acid and its metabolites in the urine of volunteers, treated with p-aminobenzoic acid sunscreen formulation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, 1430–1436
102. Gonzalez, H.; Jacobson, C.-E.; Wennberg, A.-M.; Larko, O.; Farbrot, A. Solid-Phase Extraction and Reverse-Phase HPLC: Application to Study the Urinary Excretion Pattern of Benzophenone-3 and its Metabolite 2,4-Dihydroxybenzophenone in Human Urine. *Anal. Chem. Insights* **2008**, 3, 1–7
103. Gonzalez, H.G.; Farbrot, A.; Larko, O. Percutaneous absorption of benzophenone-3, common component of topical sunscreens. *Clin. Exp. Dermatol.* **2002**, 27, 691–694
104. Jiang, R.; Roberts, M.S.; Collins, D.M.; Benson, H.A.E. Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults. *Brit. J. Clin. Pharmacol.* **1999**, 48, 635–637
105. Diaz-Cruz, M.S.; Barcelo, D. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends Anal. Chem.* **2009**, 28, 708–717
106. Schlupmf, M.; Kypke, K.; Vokt, C.C.; Birchler, M.; Durrer, S.; Faass, O.; Ehenes, C.; Feutsch, M.; Gaille, C.; Henseler, M.; Hofkamp, L.; Maerkel, K.; Reolon, S.; Zenker, A.; Timms, B.; Tresguerres, J.A.F.; Lichtensteiger, W. Endocrine Active UV Filters: Developmental Toxicity and Exposure Through Breast Milk. *Chimia* **2008**, 62, 345–351
107. Danovaro, R.; Bongiorni, L.; Giovannelli, D.; Damiani, E.; Astolfi, P.; Greci, L.; Pusceddu, A. Sunscreens Cause Coral Bleaching by Promoting Viral Infections. *Environ. Health Perspect.* **2008**, 116, 441–447

108. MacManus-Spencer, L.A.; Tse, M.L.; Klein, J.L.; Kracunas, A.E. Aqueous Photolysis of the Organic Ultraviolet Filter Chemical Octyl Methoxycinnamate. *Environ. Sci. Technol.* **2011**, 45, 3931-3937
109. Sakkas, V.A.; Giokas, D.L.; Lambropoulou, D.A.; Albanis, T.A. Aqueous photolysis of the sunscreen agent octyl-dimethyl-p-aminobenzoic acid. Formation of disinfection byproducts in chlorinated swimming pool water. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1016, 211-222
110. Yamamoto, T.; Nakajima, D.; Goto, S.; Onodera, S.; Yasuhara, A.; Sakai, S.; Soma, M. Mutagenicity of Chlorination Products of Benzophenone and Its Derivatives. *J. Environ. Chem.* **2004**, 14, 335-342
111. Nakajima, M.; Kawakami, T.; Niino, T.; Takahashi, Y.; Onodera, S. Aquatic Fate of Sunscreen Agents Octyl-4-methoxycinnamate and Octyl-4-dimethylamino-benzoate in Model Swimming Pools and Mutagenic Assays of Their Chlorination By-products. *J. Health Sci.* **2009**, 55, 363-372
112. Giokas, D.L.; Sakkas, V.A.; Albanis, T.A. Determination of residues of UV filters in natural waters by solid-phase extraction coupled to liquid chromatography-photodiode array detection and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1026, 289-293
113. Lipinski, C.A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discov. Today: Technol.* **2004**, 1, 337-341

Anna Sobańska