

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

„Oznaczanie małych peptydów za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas w aspekcie badań antydopingowych”

Autorka pracy: mgr Katarzyna Wojtkowiak

Promotor: prof. dr hab. Ewa Bulska, Uniwersytet Warszawski, Wydział Chemii

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Dorota Kwiatkowska, Polskie Laboratorium

Antydopingowe w Warszawie, profesor afiliowany UW

Celem niniejszej pracy było opracowanie, udoskonalenie oraz walidacja metod oznaczania peptydów o masie $<2\text{kDa}$ w próbkach moczu ludzkiego za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, na potrzeby analizy antydopingowej. Ze względu na specyfikę chemiczną badanej grupy peptydów, a w szczególności ich niską stabilność w roztworach oraz materiałach biologicznych, konieczne były rozszerzone, niestandardowe, a tym samym zaawansowane badania pozwalające na optymalizację parametrów analitycznych zaproponowanej procedury pomiarowej.

W ramach badań wstępnych skoncentrowano się na ograniczeniu efektu utraty analitów w trakcie przygotowania próbek do dalszej analizy instrumentalnej. Szczególną uwagę zwrócono na etapy obarczone wysokim ryzykiem wystąpienia wspomnianych efektów, przede wszystkim etapów przechowywania próbek oraz procesu odparowania. Oceniono wpływ temperatury, rodzaju zastosowanych materiałów zużywalnych, dodatku substancji stabilizujących, czy wpływ ciśnienia i ekspozycji próbek na dostęp powietrza. Zebrane dane stanowiły podstawę wyboru warunków przygotowania próbek stosowanych w dalszej części badań.

Kolejny etap to weryfikacja możliwości zastosowania klasycznych metod przygotowania próbek do analizy związków niskocząsteczkowych techniką LC-MS/MS pod kątem wiarygodności uzyskiwanych wyników. Wytypowane procedury poddano szczegółowej walidacji, zgodnej z wymaganiami stawianymi metodom przesiewowym i potwierdzającym stosowanym w kontroli antydopingowej. Dwie z nich wdrożono do zakresu akredytacji

laboratorium i z powodzeniem stosowano podczas testów biegłości stanowiących element polityki jakości Światowej Agencji Antydopingowej.

Efektem przeprowadzonej walidacji było opracowanie metod, które umożliwiają oznaczanie znacznie większej liczby metabolitów badanych peptydów, w porównaniu do opisanych w literaturze. Co więcej, dzięki zastosowaniu uniwersalnej metody przygotowania próbek jaką jest SPE, w połączeniu z łagodnymi warunkami odparowania, zaproponowane metody mają charakter otwarty i mogą znaleźć zastosowanie do analizy płynów ustrojowych pod kątem oznaczania innych substancji o właściwościach zasadowych występujących w formie niezwiązanej, w tym związków termolabilnych. Z kolei użycie techniki LC-MS/MS pozwala skuteczne i szybkie rozdzielenie oraz identyfikację analitów, a w konsekwencji na wysoką przepustowość metody, kluczową zarówno dla analiz antydopingowych, jak i np. badań klinicznych, toksykologicznych czy analizy próbek zabezpieczonych w postępowaniach sądowych.

Celem ostatniej części badań było wskazanie potencjalnego markera lub markerów obecnych w moczu, po jednorazowym lub wielokrotnym doustnym podaniu ochotnikom heksareliny. Wykorzystanie wysokorozdzielczej spektrometrii mas pozwoliło na identyfikację heksareliny oraz jej metabolitów w próbkach zebranych przez uczestników badania. Z kolei analiza techniką UHPLC-MS/MS posłużyła do opisania po raz pierwszy profilu eliminacji heksareliny drogą nerkową po doustnym podaniu peptydu.

Oprócz waloru poznawczego, zgromadzone dane znalazły zastosowanie aplikacyjne, ponieważ wykazano, że monitorowanie heksareliny oraz metabolitu 1-3, FA pozwala na istotne wydłużenie okna wykrywalności po doustnym podaniu peptydu. Udowodniono również, że zaproponowana metoda jest komplementarna do metody rutynowo stosowanej w laboratoriach antydopingowych, ponieważ umożliwia potwierdzenie przyjęcia peptydu w dawce nie wpływającej na stężenie hormonów P-III-NP i IGF-1 we krwi.