

**UNIwersytet ŁÓDZKI**  
**WYDZIAŁ CHEMII**  
**KATEDRA CHEMII ŚRODOWISKA**

Patrycja Olejarz

**CHROMATOGRAFICZNE BADANIA  
WYBRANYCH LEKÓW  
PRZECIWWIRUSOWYCH W PRÓBKACH  
BIOLOGICZNYCH**

**ROZPRAWA DOKTORSKA**

**Promotor:**

dr hab. Grażyna Chwatko, prof. UŁ

**Promotor pomocniczy:**

dr Kamila Borowczyk

**Łódź, 2023**



## **Składam Serdeczne Podziękowania dla**

**Pani dr. hab. Grażyny Chwatko, prof. UŁ**

*za poświęcony czas, życzliwość,  
cenne uwagi przekazywane w dużym spokoju,  
wszechstronną pomoc,  
która była dużym wsparciem podczas pisania niniejszej rozprawy doktorskiej.*

**Pani dr. Kamili Borowczyk**

*za powierzenie interesującego tematu badań,  
wszelkie cenne porady i wskazówki,  
a także nieocenioną pomoc podczas pisania pracy.*

*Pragnę podziękować też wszystkim **Pracownikom Katedry Chemii Środowiska** za  
życzliwość, która spotykała mnie na każdym kroku,  
a także wspaniałą atmosferę w pracy.*

*Dziękuję również moim Rodzicom, chłopakowi, przyjaciołom i współpracownikom,  
których wsparcie podczas realizowania niniejszej pracy było nieocenione.*



## **SPIS TREŚCI**

WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI.....	7
WPROWADZENIE .....	8
Część literaturowa .....	10
1. WIRUSY HIV I HBV – INFORMACJE OGÓLNE .....	11
1.1. Podstawowe informacje o HIV .....	11
1.2. Podstawowe informacje o HBV .....	14
2. TERAPIA PRZECIWWIRUSOWA ZAKAŻEŃ HIV I HBV .....	16
2.1. Leczenie zakażenia HIV .....	16
2.2. Tenofowir – informacje ogólne.....	18
2.3. Leczenie zakażenia HBV .....	20
2.4. Entekawir – podstawowe informacje .....	23
3. KREATYNINA – BIOCHEMICZNY MARKER OCENY FUNKCJONOWANIA NEREK.....	24
4. CHARAKTERYSTYKA PŁYNÓW BIOLOGICZNYCH.....	26
4.1. Mocz.....	26
4.2. Krew .....	29
4.3. Ślina.....	33
5. METODY OZNACZANIA TFV I ENT W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH.....	37
5.1. Chromatograficzne metody oznaczania TFV w próbkach biologicznych .....	37
5.2. Chromatograficzne metody oznaczania ENT w próbkach biologicznych.....	44
CEL PRACY .....	49
Część eksperymentalna .....	51
6. ODCZYNNIKI, APARATURA, MATERIAŁ DO BADAŃ .....	52
Wyniki .....	55
7. OPRACOWANIE PROCEDURY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA TFV I CRN W MOCZU .....	56
7.1. Dobór warunków rozdzielania TFV i Crn w moczu .....	56
7.2. Przygotowanie próbki do analizy .....	62
7.3. Stabilność TFV i Crn w moczu .....	63
7.4. Walidacja metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn.....	65
7.5. Oznaczenie zawartości TFV w moczu i wyznaczenie profilu farmakokinetycznego .....	67

<b>8. OPRACOWANIE METODY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA TFV I CRN W OSOCZU KRWI CZŁOWIEKA .....</b>	<b>69</b>
8.1. Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego.....	70
8.2. Przygotowanie próbki do analizy .....	72
8.3. Badania trwałości TFV i Crn w osoczu krwi człowieka .....	74
8.4. Walidacja opracowanej metody.....	77
<b>9. OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA TFV W ŚLINIE.....</b>	<b>80</b>
9.1. Warunki separacji chromatograficznej .....	80
9.2. Przygotowanie próbki do analizy .....	81
9.3. Badanie trwałości TFV w ślinie .....	82
9.4. Walidacja i wykorzystanie metody.....	84
<b>10. OZNACZANIE ENT Z WYKORZYSTANIEM DETEKCJI SPEKTROFOTOMETRYCZNEJ.....</b>	<b>86</b>
10.1. Optymalizacja procedury jednoczesnego oznaczania ENT i Crn w próbkach moczu.....	87
10.2. Opracowanie metody jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w osoczu krwi człowieka .....	97
10.3. Oznaczanie ENT w próbkach śliny .....	105
<b>11. OZNACZANIE ENT Z WYKORZYSTANIEM DETEKCJI SPEKTROFLUORYMETRYCZNEJ .....</b>	<b>109</b>
11.1. Opracowanie metody oznaczenia ENT w moczu .....	109
11.2. Rozwinięcie metody separacji i identyfikacji ENT w osoczu krwi i ślinie.....	118
<b>12. Dyskusja Wyników .....</b>	<b>125</b>
12.1. Oznaczanie TFV w próbkach biologicznych.....	126
12.2. Oznaczanie ENT w próbkach biologicznych .....	138
<b>PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE.....</b>	<b>147</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>150</b>
<b>SPIS RYCIN.....</b>	<b>165</b>
<b>SPIS TABEL .....</b>	<b>170</b>
<b>STRESZCZENIE .....</b>	<b>172</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>173</b>
<b>DOROBEK NAUKOWY .....</b>	<b>174</b>

## WYKAZ SKRÓTÓW I SYMBOLI

AIDS	– zespół nabytego niedoboru odporności
ALT	– aminotransferaza alaninowa
AST	– aminotransferaza asparginianowa
cART	– skojarzona terapia przeciwwirusowa
Crn	– kreatynina
DNA	– kwas deoksyrybonukleinowy
ENT	– entekawir
FLD	– detektor spektrofluorymetryczny
HBV	– wirus zapalenia wątroby typu B
HCC	– rak wątrobowokomórkowy
HIV	– ludzki wirus niedoboru odporności
HPLC	– wysokosprawna chromatografia cieczowa
HPLC-UV	– wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją spektrofotometryczną
LOD	– granica wykrywalności
LOQ	– granica oznaczalności
MeCN	– acetonitryl
MeOH	– metanol
MS	– spektrometria mas
PB	– bufor fosforanowy
PCA	– kwas chlorowy(VII)
RNA	– kwas rybonukleinowy
RSD	– względne odchylenie standardowe
SD	– odchylenie standardowe
TAF	– alafenamid tenofowiru
TCA	– kwas trichlorooctowy
TDF	– fumaran dizoproksylu tenofowiru
TFV	– tenofowir
UNAIDS	– Wspólny Program Narodów Zjednoczonych ds. HIV/AIDS
WHO	– Światowa Organizacja Zdrowia
WZW B	– zapalenie wątroby typu B

## WPROWADZENIE

Zdrowie i długość życia człowieka są zależne od otoczenia w którym żyje, sposobu funkcjonowania, genów i poziomu opieki medycznej. Styl życia odpowiada w dużej mierze (ok. 50%) za jego długość. W przypadku wielu chorób zakaźnych znaczenie mają przede wszystkim zachowania seksualne oraz narażenie na patogeny przenoszone przez krew, w tym bardzo niebezpieczne zakażenia ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV) i wirusem zapalenia wątroby typu B (HBV). Wirusy te stanowią poważny problem epidemiologiczny, społeczny i kliniczny zarówno w Polsce jak i na świecie [1].

Aby powstrzymać rozprzestrzenianie się wspomnianych wirusów na całym świecie zaleca się stosowanie terapii przeciwwirusowych u osób zakażonych. Zadaniem terapii jest nie tylko zmniejszyć ilość przypadków śmiertelnych, ale również poprawić jakość i wydłużyć czas życia u osób zainfekowanych. Obecnie w leczeniu pacjentów zakażonych HBV i HIV zaleca się stosowanie leków takich jak tenofowir (TFV) i entekawir (ENT).

Leki wykorzystywane w terapii zakażeń wirusami HIV/HBV obarczone są wieloma działaniami niepożądanymi, które wpływają negatywnie zarówno na zdrowie jak i jakość życia osób chorych. Większość wytycznych dotyczących leczenia HIV/HBV zaleca monitorowanie poziomu tych leków w organizmie. Aktualne zalecenia wskazują na konieczność kontrolowania czynności nerek u pacjentów poddawanych terapii tymi lekami.

Ryzyko związane z toksycznością leków przeciwwirusowych dla nerek zależy przede wszystkim od ich stężenia, ponieważ są wydalane głównie przez kanaliki nerkowe. Monitorowanie zawartości wyżej wymienionych leków w płynach ustrojowych pacjentów jest przydatne do kontrolowania dawek terapeutycznych. Jest to również ważne dla ustalenia wpływu terapii na prawidłowe funkcje nerek. Skuteczność filtracji nerkowej podczas terapii może być wyznaczana poprzez pomiar stężenia kreatyniny (Crn) w próbkach moczu. Nieprawidłowy poziom kreatyniny wyraźnie wskazuje na choroby nerek. Jest to podstawowy test przeprowadzany w przypadku podejrzenia dysfunkcji kanalików nerkowych.

Zważając na rosnącą liczbę publikowanych prac dotyczących oznaczania wybranych leków przeciwwirusowych wykorzystujących bardzo drogi sprzęt generujący wysokie koszty analiz oraz skomplikowane procedury przygotowania próbek do analizy,



konieczne jest dostarczenie nowych, dokładnych, precyzyjnych i prostych metod do oznaczania ich zawartości w różnych matrycach biologicznych.

Dodatkowo, obecne zagadnienia związane z zieloną chemią, które stanowią powszechny trend w laboratoriach analitycznych, stały się podstawą do redukcji bądź eliminacji użycia toksycznych chemikaliów, zarówno na etapie przygotowania próbek jak i w końcowej analizie chromatograficznej.

W niniejszej rozprawie doktorskiej prezentuję opracowane w toku studiów doktoranckich, metody oznaczania TFV, ENT i kreatyniny w materiale biologicznym człowieka. Podstawową techniką separacji wykorzystywaną w niniejszych badaniach jest wysokosprawną chromatografią cieczową (HPLC) z detekcją spektrofotometryczną (UV), rozpowszechnioną w laboratoriach na całym świecie i doskonale sprawdzająca się w analizie próbek biologicznych. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów zaprezentowałam w części eksperymentalnej rozprawy doktorskiej.

## **CZĘŚĆ LITERATUROWA**

# 1. WIRUSY HIV I HBV – INFORMACJE OGÓLNE

## 1.1. Podstawowe informacje o HIV

Ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) jest etiologicznym czynnikiem nabytego zespołu niedoboru immunologicznego (AIDS). HIV należy do rodziny retrowirusów, a jego cząsteczka zawiera dwie nici kwasu rybonukleinowego (RNA) [2,3]. Retrowirusy charakteryzuje obecność enzymu – odwrotnej transkryptazy, która przepisuje zawartą w nim informację genetyczną na kopię kwasu deoksyrybonukleinowego (DNA) w zakażonej komórce. Taki proces umożliwia integrację HIV w DNA gospodarza i wykorzystanie komórki do wytwarzania nowych wirusów [3,4]. HIV zakaża komórki układu odpornościowego i jest w stanie osłabić lub zniszczyć jego funkcje. W wyniku tej infekcji obserwuje się postępujące pogorszenie stanu układu odpornościowego, prowadzące do „niedoboru odporności” [5]. Atakuje on w organizmie człowieka limfocyty T-pomocnicze, posiadające na swojej powierzchni receptor CD4, a także makrofagi i komórki dendrytyczne [2,4]. Proces zakażenia komórek jest skutkiem interakcji pomiędzy komórką wrażliwą, a cząsteczką wirusa i składa się z następujących etapów:

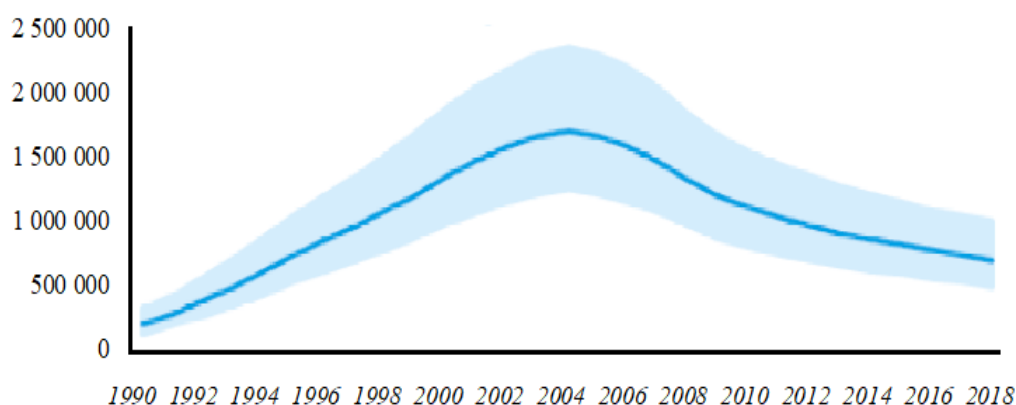
- ✚ dołączenie cząsteczki wirusa do powierzchni komórki,
- ✚ ingerencja wirusa w błonę komórkową,
- ✚ przenikanie wirusa do cytoplazmy,
- ✚ konwersja RNA wirusowego do DNA,
- ✚ przeniknięcie DNA do jądra komórkowego,
- ✚ replikacja wirusa [4].

Istnieją trzy główne drogi zakażenia HIV: poprzez kontakt krwi z krwią zakażoną, stosunek seksualny z zakażoną osobą oraz przeniesienie wirusa z matki na dziecko podczas ciąży, porodu czy karmienia piersią [5]. Konsekwencją zakażenia wirusem HIV są ogólnoustrojowe skutki, począwszy od pierwotnej infekcji, poprzez stadium bezobjawowe (średnio 8-10 lat), aż do zaawansowanej choroby, która bardzo często prowadzi do śmierci. Objawy kliniczne ostatniego stadium choroby można podzielić na kilka grup: ogólne, dermatologiczne, kardiologiczne, trawienne, hematologiczne, neurologiczne, ginekologiczne. Aby zarazić się HIV, musi dojść do bezpośredniej ekspozycji świeżego materiału zakaźnego z raną otwartą lub błonami śluzowymi żywiciela. Wirusem tym nie da się zarazić poprzez przebywanie w tym samym pomieszczeniu, korzystanie z tej samej toalety, kaszel, katar czy używanie tych samych

sztućców. Zwierzęta, komary oraz inne owady nie przenoszą zakażenia poprzez ukąszenie [6].

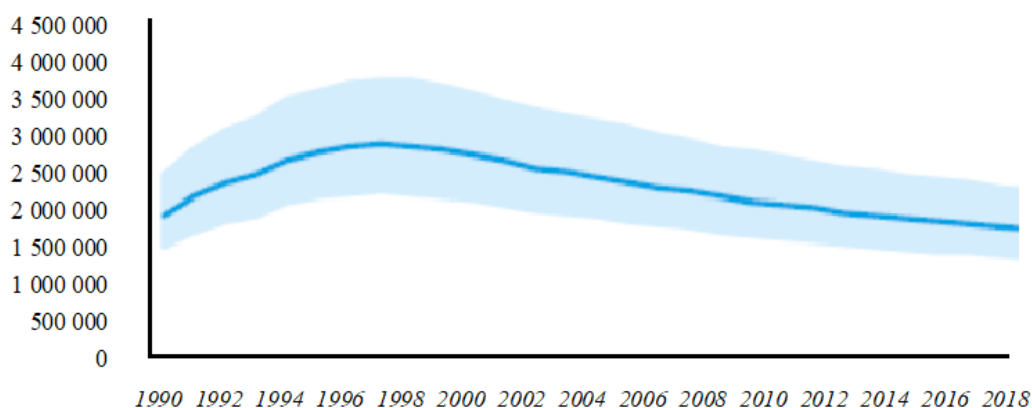
Pierwszy przypadek zakażenia wirusem wywołującym nieznaną chorobę, zwaną później AIDS, opisany został w roku 1981 w czasopiśmie *New England Journal of Medicine*. W Polsce pierwszy przypadek zakażenia HIV odnotowano w 1985 r., a w roku 1986 po raz pierwszy zidentyfikowano AIDS [7,8]. Obecnie, według raportu Wspólnego Programu Narodów Zjednoczonych ds. HIV / AIDS (UNAIDS) z 2018 r., aż 37,9 mln ludzi na całym świecie żyje z ludzkim wirusem niedoboru odporności [9]. W Polsce w 2018 roku odnotowano 23 656 przypadków zakażenia HIV [10].

Opracowanie statystyczne raportu ekspertów ze stowarzyszenia UNAIDS z 2019 roku przedstawia dokładne dane dotyczące ilości zgonów spowodowanych zakażeniem HIV, ilości osób nowo zainfekowanych oraz podział na grupy związany z ryzykiem zakażenia. Rycina 1 przedstawia roczną liczbę zgonów na świecie spowodowanych chorobą AIDS wśród osób żyjących z HIV. Odsetek ten spadł znacząco z maksimum wynoszącego 1,7 miliona osób w 2004 roku do 770 000 w 2018 roku. Od 2010 r. śmiertelność spadła o 33% wszystkich rozpoznanych zakażeń. Warto podkreślić, że obecnie jest to bardzo dobry wynik, a wymaganiem jest ciągle utrzymanie trendu spadkowego dla umieralności z powodu choroby AIDS.



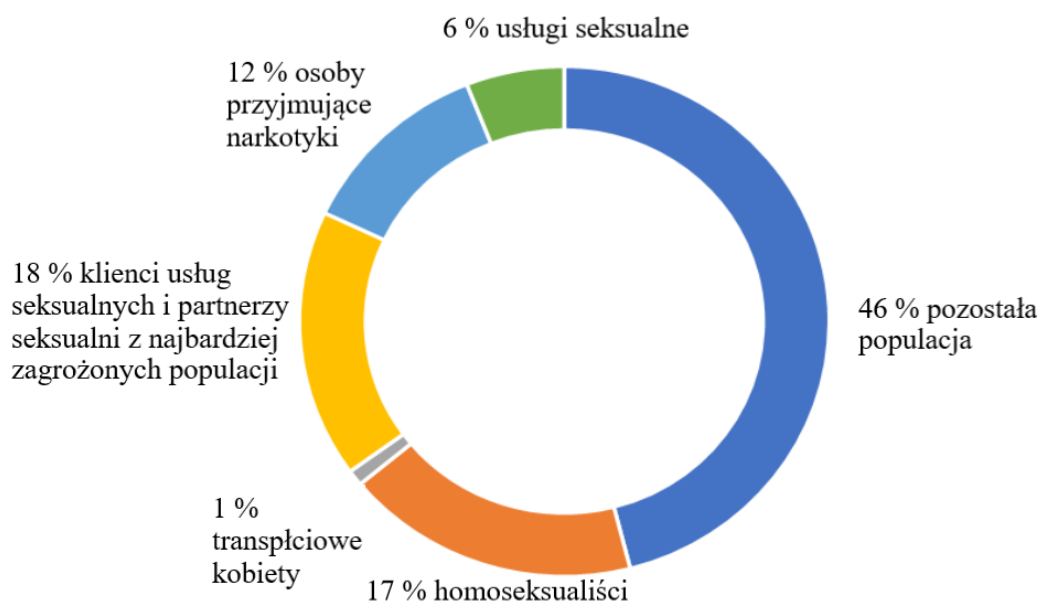
**Ryc. 1.** Globalna liczba zgonów związanych z AIDS w latach 1990–2018. Źródło: Raport UNAIDS 2019.

Rycina 2 prezentuje wyniki dotyczące rocznej liczby nowych zakażeń HIV na świecie. Liczba ta maleje stopniowo od 1997 roku, gdzie liczba nowo zakażonych osób wynosiła około 3 miliony dla całej populacji. Od 2010 roku spadła z 2,1 miliona do 1,7 miliona w roku 2018, czyli o około 16%. Trend spadkowy stale się utrzymuje i pożądanym jest, aby w roku 2020 nowych infekcji było mniej niż 500 000.



**Ryc. 2.** Globalna liczba nowych zakażeń HIV w latach 1990–2018. Źródło: Raport UNAIDS 2019

Rycina 3 przedstawia procentowy udział zakażeń HIV w różnych grupach społecznych. Obecnie, spośród wszystkich zakażeń 18% odnotowuje się wśród klientów usług seksualnych, 17% stanowią zakażenia pochodzące z kontaktów homoseksualnych mężczyzn, zaś dożylne przyjmowanie narkotyków stanowi ok. 12% całości nowo wykrytych infekcji. Jeszcze w latach 90-tych XX w. grupa, wymieniona jako ostatnia, stanowiła 70% osób zakażonych. Obserwowana zmiana świadczy o większej świadomości związanej z przenoszeniem tego wirusa przez krew [3,11].



**Ryc. 3.** Dystrybucja nowych zakażeń HIV przedstawiona w oparciu o grupy populacji w odniesieniu do roku 2018. Źródło: Raport UNAIDS 2019.

Pomimo, iż w krajach wysoko rozwiniętych zmniejszyła się liczba nowo wykrytych zakażeń, to nadal rozprzestrzenianie się HIV jest istotnym problemem w krajach rozwijających się tzw. krajach wysokiego ryzyka, a dominującą drogą zakażenia stały się ryzykowne kontakty seksualne [11].

## 1.2. Podstawowe informacje o HBV

Wirus zapalenia wątroby typu B (HBV) jest hepatotropowym wirusem DNA i należy do rodziny *Hepadnaviridae*. Składa się on z białkowego rdzenia zawierającego niekompletną, podwójną, kolistą nić DNA. W nukleokapsydzie wirusa znajdują się: DNA HBV, antygen rdzeniowy c (HBcAg), antygen e (HBeAg), kinaza białkowa oraz swoista polimeraza DNA-zależna [12]. Zasadniczym elementem struktury HBV jest lipoproteinowa otoczka stanowiąca antygen powierzchniowy (HBsAg). Dzięki niej HBV łączy się z hepatocytami, a w wyniku procesu endocytozy zachodzi proces przeniknięcia nukleokapsydów do cytoplazmy. Wirusowe nukleokapsydy z cytoplazmy transportowane są do błony jądrowej, gdzie dochodzi do wnikięcia DNA wirusa do jądra komórkowego [13]. Cechą charakterystyczną wirusa HBV jest jego bardzo duża dynamika replikacji [14].

Przeciwciała zorientowane przeciwko antygenowi powierzchniowemu HBsAg wiążą HBV zapobiegając łączeniu wirusa z hepatocytami. Jest to jedyny sposób chroniący przed zainfekowaniem, dlatego też cząsteczki HBsAg stanowią podstawę produkcji szczepionek przeciw HBV [15].

Markery wirusowego zapalenia wątroby to krążące we krwi białka, specyficzne dla konkretnych wirusów, powodujących zapalenie wątroby. Najczęściej, markery serologiczne wykorzystywane są w diagnostyce wirusowego zapalenia wątroby typu B (WZW B), które jest najpowszechniej występującym zapaleniem wątroby i mają istotne znaczenie w diagnostyce przebiegu choroby. Podstawowym markerem w diagnostyce zakażeń HBV jest HBsAg. Dostarcza on informacji o zainfekowaniu organizmu już w 4.-12. tygodniu infekcji, jednak nie daje informacji na temat stopnia zakażenia, replikacji HBV, czy objawów choroby. DNA HBV jest jego najważniejszym markerem. Dostarcza ono niezbędnych informacji na temat aktywności replikacji wirusa, celowości terapii przeciwwirusowej, skuteczności leczenia, oporności na leki, a także o stopniu zakaźności [12,16].

Zakażenie HBV może przybierać dwie postaci:

- ✚ ostrego WZW B,

 przewlekłego WZW B.

Ostre WZW B zazwyczaj przebiega z objawami rzekomo-grypowymi, bardzo często występuje żółtaczka, ściemnienie oczu, odbarwienie stolca, wysypka, zmęczenie, ból brzucha i nudności. Charakteryzuje się podwyższonymi wartościami aminotransferazy alaninowej (ALT), aminotransferazy asparaginianowej (AST) i bilirubiny, a przebieg uzależniony jest od chorób współistniejących takich jak: przewlekłe zapalenie wątroby typu C, cukrzyca oraz alkoholizm [12]. HBsAg wykrywany jest przez cały czas trwania ostrego zapalenia wątroby, a ilościowe oznaczenie pozwala kontrolować skuteczność terapii przeciwwirusowej. Przeciwciała przeciwko HBsAg pojawiają się w surowicy w końcowym okresie ostrego zapalenia wątroby ok. 4.-6. miesiąca od zakażenia. Ich obecność świadczy o zahamowaniu replikacji HBV przez układ odpornościowy [16]. U osób wykazujących ogólny dobry stan zdrowia przed zakażeniem HBV, w ok. 90% przypadków ostre WZW B kończy się wyzdrowieniem [12]. Niestety, materiał genetyczny HBV zostaje wpisany w DNA osoby zakażonej i w przyszłości możliwa jest reaktywacja replikacji HBV. Dlatego też leczenie przeciwwirusowe obejmuje głównie zahamowanie replikacji wirusa i progresji marskości wątroby [17].

Przewlekłe zapalenie wątroby objawia się w momencie, w którym HBsAg utrzymuje się w organizmie powyżej 6 miesięcy, poziomy ALT i AST stale, bądź okresowo są podwyższone, a DNA wirusa HBV w surowicy sięga wartości  $10^5$  kopii/ml [18]. Podczas przewlekłego zapalenia wątroby osoby zakażone bardzo często nie odczuwają żadnych objawów prócz zmęczenia i obniżonego nastroju, a w badaniach zauważalne jest jedynie lekkie powiększenie wątroby. Bardzo często na tym etapie wykonanie biopsji potwierdza marskość wątroby, obserwowane są zmiany martwicze i stan zapalny, a także poza wątrobowe powikłania, takie jak: kłębuszkowe zapalenie nerek, czy guzkowe zapalenie tętnic [18]. Nieleczone, przewlekłe zapalenie wątroby stanowi duży problem epidemiologiczny, ponieważ bardzo często prowadzi do pierwotnego nowotworu wątrobowokomórkowego (HCC) [19]. Poważne powikłania, w tym marskość wątroby i HCC, rozwijają się u 15–40% przewlekłe zakażonych HBV. W ciągu 5 lat umiera 14–20% chorych z wyrównaną marskością, a z niewyrównaną od 70% do 80% zakażonych [20].

HBV podobnie jak HIV, transmitowany jest pozajelitowo poprzez krew oraz płyny ustrojowe. Główne drogi zakażenia obejmują uszkodzoną skórę i płyny ustrojowe,

np. w trakcie kontaktu seksualnego, czy zakażenia okołoporodowego. Dodatkowo, wysokim czynnikiem ryzyka zakażenia HBV są inwazyjne procedury diagnostyczne i lecznicze wykorzystujące nieprawidłowo odkażony sprzęt wielokrotnego użytku. Korzystanie z usług w salonach tatuażu, akupunktury i kosmetycznych stanowią również potencjalne ryzyko zakażenia związane z nieprawidłowym wysterylizowaniem sprzętu [19].

HBV został odkryty przez dr. Barucha Blumberga w 1965 roku i za to odkrycie został on uhonorowany Nagrodą Nobla. We współpracy z dr. Blumbergiem, mikrobiolog Irving Millman pomógł opracować badanie krwi w kierunku HBV, a banki krwi zaczęły używać opracowanego testu w 1971 roku. W 1969 roku dr. Blumberg i Millman opracowali pierwszą szczepionkę przeciw WZW B. W 1981 roku Agencja Żywności i Leków (FDA) zatwierdziła pierwszą komercyjną szczepionkę przeciwko HBV pochodzącą z osocza, przeznaczoną do stosowania u ludzi. Ten typ szczepionki był pozyskiwany z surowicy osób przewlekle zakażonych HBV z dodatnim HBsAg. Kolejna generacja szczepionki przeciw HBV zatwierdzona została w 1986 roku. Była to rekombinowana szczepionka, a materiał wyizolowany był z komórek drożdży zaszczepionych genem pochodzącym z HBsAg. Ten rodzaj szczepionki stosowany jest do dnia dzisiejszego. W Polsce szczepienia przeciw HBV wprowadzono do Programu Szczepień Ochronnych po raz pierwszy w roku 1989 [21,22].

WHO szacuje, iż obecnie 325 milionów ludzi na całym świecie żyje z WZW typu B i/lub C, a w samym 2017 roku, 1,1 miliona osób zostało nowo zarażonych tym wirusem. Globalna strategia WHO dotycząca zapalenia wątroby, zatwierdzona przez wszystkie państwa członkowskie, ma na celu zmniejszenie liczby nowych zakażeń wirusem zapalenia wątroby o 90% i zgonów o 65% w latach 2016–2030 [23].

## **2. TERAPIA PRZECIWWIRUSOWA ZAKAŻEŃ HIV I HBV**

### **2.1. Leczenie zakażenia HIV**

Problematyka leczenia zakażeń HIV przeszła rewolucje terapeutyczne od czasu izolacji pierwszego wirusa w 1983 roku [24]. Zastosowanie leków antyretrowirusowych w terapii HIV pozwoliło na wydłużenie czasu jaki upływał pomiędzy zakażeniem, a upośledzeniem układu immunologicznego w fazie determinującej rozwój choroby AIDS [25]. Pozwoliło to na znaczne zahamowanie progresji choroby, co istotnie poprawiło rokowania osób śmiertelnie chorych. Niestety, HIV bardzo często mutuje wykazując zdolność do uodparniania się na stosowane preparaty farmaceutyczne, dlatego



też monoterapia wobec retrowirusa o bardzo dużym potencjale replikacyjnym bardzo często stawała się nieskuteczna [26].

Kluczowym momentem w terapii zakażeń HIV było wprowadzenie wysoce aktywnej skojarzonej terapii przeciwretrowirusowej (cART) [24,26]. Terapia ta polega na zastosowaniu kombinacji kilku synergistycznie działających leków antyretrowirusowych. Schemat terapii obejmuje zastosowanie połączenia dwóch inhibitorów odwrotnej transkryptazy nukleozydowych (NRTIs), bądź nukleotydowych (NtRTI) z jednym nienukleozydowym inhibitorem odwrotnej transkryptazy (NNRTIs), inhibitorem proteazy (PIs) [27], a także z inhibitorem integrazy (INSTI) [24,28,29]. Nukleozydowe i nukleotydowe analogi odpowiadają za powstrzymanie aktywności odwrotnej transkryptazy HIV, co prowadzi do zablokowania centrum aktywnego enzymu. Nienukleozydowe inhibitory są odpowiedzialne za hamowanie odwrotnej transkryptazy poza centrum aktywnym, blokując powstawanie konformacji umożliwiających działanie enzymów. Inhibitory proteazy blokując centrum aktywne proteazy, prowadzą do zahamowania powstania wirionów i zamknięcia cyklu replikacyjnego wirusa, a inhibitory integrazy hamują działanie enzymu integrazy, odpowiedzialnej za połączenie materiału genetycznego wirusa HIV z DNA człowieka [27,28]. Przykłady poszczególnych leków zamieszczono w tabeli 1.

Wprowadzenie leczenia skojarzonego dla zakażeń HIV stało się wielkim sukcesem w historii współczesnej medycyny. Celem leczenia HIV jest maksymalne zahamowanie replikacji wirusa. Terapia cART nie eliminuje całkowicie replikacji, dlatego jest ona obowiązkowa dożywotnio u osób zakażonych, aby zapewnić jak największą supresję wirusa, poprawę funkcji układu immunologicznego, obniżenie śmiertelności oraz poprawę jakości życia chorego. Na przestrzeni 15 lat śmiertelność związana z zakażeniem HIV została zredukowana o 50%, a obecnie chorobę AIDS wywołaną HIV uważa się za kontrolowaną chorobę przewlekłą [28]. Korzyści płynące z cART doprowadziły do jej powszechnej rekomendacji przez Polskie Towarzystwo Naukowe AIDS, *European AIDS Clinical Society* w Europie oraz przez *Department of Health and Human Services* w Stanach Zjednoczonych. Każda z powyższych organizacji zaleca rozpoczęcie terapii bezzwłocznie, gdy liczba limfocytów CD4 spada poniżej 200 w jednym mikrolitrze krwi [24,30].

Leczenie antywirusowe często obarczone jest działaniami niepożądanymi ze strony zaburzeń żołądkowo-jelitowych. Ponadto, niektóre leki mogą wywoływać wystąpienie choroby niedokrwiennej serca, zespołu insulinooporności, bądź innych

konsekwencji przewlekłej terapii, prowadząc do wyłączenia pacjenta z terapii. Z tego względu dopracowanie schematu terapii stanowi wyzwanie na przyszłość [26,30]. Decydując się na zastosowanie terapii antywirusowej, szczególną uwagę należy zwrócić na dobór preparatów farmaceutycznych, które oprócz skuteczności, powinny wykazywać wysoki profil bezpieczeństwa [31].

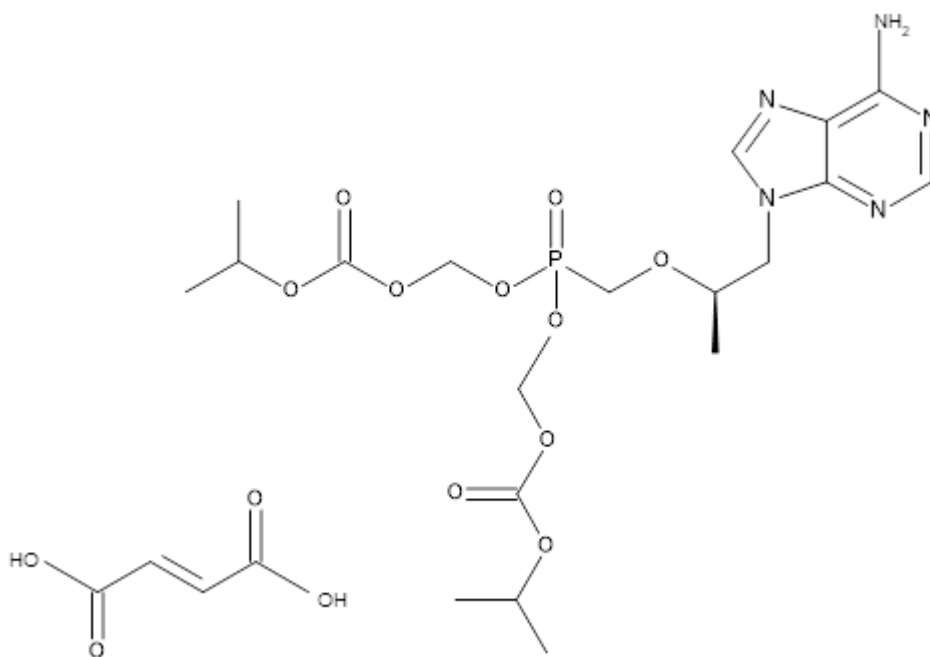
**Tabela 1.** Przykłady zatwierdzonych leków przeciwretrowirusowych [26].

<b>NRTIs</b>	<b>NtRTIs</b>	<b>NNRTIs</b>	<b>PIs</b>	<b>INSTI</b>
Zydowudyna	Tenofowir	Newirapina	Sakwinawir	Raltegrawir
Dydanozyna		Delawirdyna	Indynawir	
Stawudyna		Efawirenz	Nelfinawir	
Lawumidyna		Etrawiryna	Lopinawir	
Abakawir			Atazanawir	
Emtrycytabina			Fosamprenawir	
			Typranawir	
			Darunawir	

## 2.2. Tenofowir – informacje ogólne

Jednym z najpopularniejszych leków pierwszego rzutu w terapii HIV jest obecnie tenofowir (TFV) [32]. Ze względu na niewystarczające wchłanianie stosuje się go w postaci proleku fumaranu tenofowiru dizoproksylu (TDF) [28] z estryfikowaną grupą fosforanową, którego nazwa systematyczna to fumaran 9-[(R)-2-[[bis[[[izopropoksykarbonylo]oksy] metoksy]-fosfinylo]-metoksy]propylo]adeniny. Prolek przekształca się w TFV przez hydrolizę diestru przy użyciu esteraz surowicy i tkanek. W następnym etapie jest on fosforylowany przez enzymy komórkowe, co prowadzi do powstania difosforanu tenofowiru, aktywnej postaci leku [33]. TDF ma długi okres półtrwania wewnątrzkomórkowego, co pozwala na dawkowanie raz dziennie, przez co zachęca do przestrzegania zaleceń terapeutycznych [34]. Jest to również analog nukleotydowy, który hamuje replikację HBV [35].

TDF (Ryc. 4) uzyskał zgodę na kliniczne zastosowanie w leczeniu HIV w 2001 r., a w leczeniu zakażeń HBV w 2008 r. [36]. TFV hamuje aktywność odwrotnej transkryptazy, poprzez współzawodnictwo z 5-trifosforanem deoksyadenozyny i po włączeniu do DNA hamuje wydłużanie wirusowej nici DNA, tym samym blokując namnażanie się wirusa [28].



**Ryc. 4.** Wzór strukturalny fumaranu tenofowiru dizoproksylu (TDF).

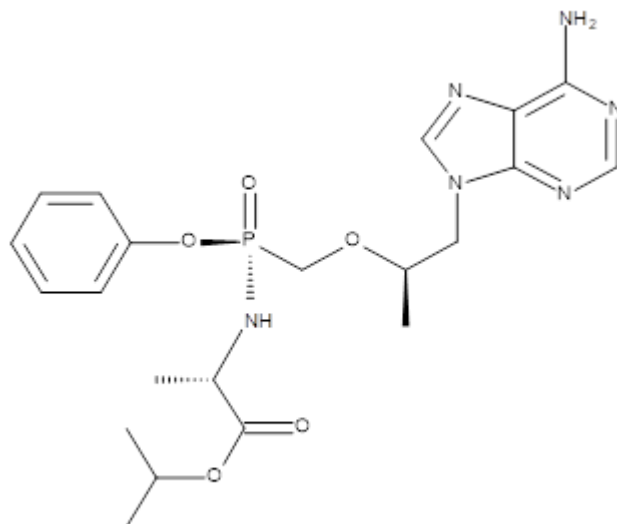
TFV charakteryzuje się wysokim profilem bezpieczeństwa, chociaż odnotowano pewne dowody na zmniejszenie gęstości mineralnej kości, istotne klinicznie zdarzenia niepożądane dotyczące zmiany czynności nerek i dysfunkcji kanalików nerkowych po zastosowaniu TFV [37,38]. Ponadto w kilku badaniach wykazano zwiększoną częstość zaburzeń czynności kanalików proksymalnych u pacjentów leczonych TFV, przypisywanych zwiększonym wewnątrzkomórkowym stężeniom TFV i bezpośredniej toksyczności mitochondrialnej w komórkach kanalików proksymalnych [39,40]. W przypadku wycofania TFV zaobserwowano szybką i znaczącą poprawę szacowanego wskaźnika filtracji kłębuszkowej [38].

Pierwszy przypadek nefrotoksyczności wywołanej przez TFV u pacjenta z HIV zarejestrowano w 2002 r. [41]. Toksyczność dla nerek może prowadzić do ich ostrego uszkodzenia, przewlekłej choroby nerek, cech urazu kanalików, w tym zespołu Fanconiego, który charakteryzuje się białkomoczem cewkowym, obecnością aminokwasów w moczu, fosfaturią, glikozurią i utratą wodorowęglanów z moczem, prowadząc do kwasicy metabolicznej [34] lub izolowanej hipofosfatemii [42].

Zbyt wysokie poziomy leku w surowicy krwi powstające w procesie metabolicznym są bezpośrednio odpowiedzialne za działania niepożądane związane ze stosowaniem TFV. Niestety dokładny mechanizm nefrotoksyczności TFV jest nadal niejasny. Uważa się, że lek gromadzi się w komórkach kanalików nerkowych i powoduje ich apoptozę poprzez bezpośrednie uszkodzenie cewek [43]. TFV jest wydalany

w postaci niezmienionej z moczem w procesie filtracji kłębuszkowej i aktywnego wydzielenia w kanalikach nerkowych [42].

Nowa postać proleku tenofowiru to alafenamid tenofowiru (TAF), którego nazwa systematyczna to propan-2-yl (2S)-2-[[[(S)-({[(2R)-1(6-amino-9Hpurin-9-yl) propan-2-yl]oksy)metylo](fenoksy)fosforylo]amino} propanian, wzór strukturalny przedstawiony jest na rycinie 5. Związek ten został zatwierdzony do stosowania w leczeniu klinicznym w 2015 r. [36].



**Ryc. 5.** Wzór strukturalny alafenamidu tenofowiru (TAF).

Okres półtrwania TAF w surowicy jest dłuższy niż okres półtrwania TDF. Nowy prolek powoduje około czterokrotnie wyższe stężenie wewnątrzkomórkowe aktywnego metabolitu difosforanu tenofowiru w porównaniu z TDF. Umożliwia leczenie niższymi dawkami w porównaniu z TDF. Ze względu na zmniejszoną dawkę TAF i lepszą stabilność, ekspozycja na TFV w osoczu jest o 90% niższa w przypadku zastosowania TAF niż w przypadku terapii TDF. W konsekwencji zmniejszenie dawki i zwiększenie trwałości leku prowadzi do zmniejszenia ryzyka objawów niepożądanych, a szczególnie nefrotoksyczności [44,45]. Stwierdzono również, że TAF ma wyższą aktywność przeciwwirusową i osiąga 5-krotnie wyższe stężenia wewnątrzkomórkowe, przy jednoczesnym zachowaniu dobrej tolerancji leku przez pacjentów [46].

### 2.3. Leczenie zakażenia HBV

Przewlekłe zakażenia HBV pozostają poważnym problemem zdrowia publicznego na całym świecie. Głównym rezultatem klinicznym rozwoju zakażenia jest przewlekłe zapalenie wątroby, prowadzące do zwłóknienia i marskości wątroby, a także raka wątrobowokomórkowego. Replikacja HBV nie wywołuje bezpośrednio efektu

cytopatycznego, uszkodzenie wątroby jest indukowane specyficzną odpowiedzią immunologiczną przeciwciał HBV przeciwko zakażonym hepatocytom. Kohortowe badania wykazały wyraźny związek między utrzymywaniem replikacji wirusa, a zaawansowaniem choroby wątroby. Długoterminowa supresja wirusa jest głównym priorytetem terapii przeciwwirusowej. Zastosowanie odpowiedniego schematu leczenia powinno skutkować poprawą wyników klinicznych pacjentów poprzez zahamowanie rozwoju włóknienia wątroby, normalizację wyników badań biochemicznych wskaźników uszkodzenia wątroby, prowadząc do powstrzymania progresji marskości wątroby oraz występowania HCC [47,48]. Oprócz tego odpowiednie leczenie ma na celu wydłużenie i poprawę jakości życia pacjentów, zapobieganie zakażeniom hepatotropowym po przeszczepach oraz redukcję ryzyka generowania dalszych zakażeń HBV w środowisku [48].

Główne środki przeciwwirusowe wykorzystywane w leczeniu zakażeń HBV zostały zatwierdzone do leczenia przez FDA i należą do dwóch głównych kategorii, w zależności od ich mechanizmu działania. Pierwszym z nich są modulatory immunologiczne, zmniejszające włóknienie przeciwnowotworowe takie jak interferon alfa-2b i peginterferon alfa-2a. Drugą klasą leków są leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym, czyli inhibitory polimerazy należące do rodziny nukleozydów i analogów nukleotydydowych:

- ✚ leki nukleozydowe: lamiwudyna (LMV), telbiwudyna (LdT), entekawir (ENT),
- ✚ leki nukleotydydowe: adefowir (ADV), fumaran dizoproksylu tenofowiru (TDF), alafenamid tenofowiru (TAF) [47-50].

Spośród analogów nukleotydydowych/nukleozydowych jedynie ENT i TDF charakteryzuje wysoka bariera genetyczna i odpowiednia siła działania, stąd leki te powinny być stosowane jako leki pierwszorazowe. Niestety, dostępne środki przeciwwirusowe są skuteczne w hamowaniu replikacji HBV, ale w wielu przypadkach nie są w stanie wywoływać przedłużonej odpowiedzi po zaprzestaniu leczenia [47].

Decyzja o wyborze schematu terapii przeciwwirusowej dla każdej z osób musi uwzględniać aktualną dostępność, skuteczność oraz wysoki profil bezpieczeństwa wykorzystywanych preparatów farmaceutycznych [49]. Podczas ustalania profilu leczenia należy dokonać wyboru między preparatami interferonu alfa, a analogami nukleozydowymi/nukleotydydowymi. Należy uwzględnić przeciwwskazania do zastosowania, które w przypadku analogów nukleozydowych/nukleotydydowych występują bardzo rzadko [51]. Zakwalifikowanie do wprowadzenia leczenia wymaga bardzo

precyzyjnej oceny wstępnej, a także konsekwentnego monitorowania przebiegu wprowadzonej terapii i jej tolerancji. Każdy z pacjentów powinien być poinformowany o długości trwania leczenia, możliwych działaniach niepożądanych wykorzystywanych preparatów farmaceutycznych, ewentualnych interakcjach pomiędzy przyjmowanymi lekami, a także wpływie przestrzegania zaleceń ustalonej terapii oraz zasadach kontynuowania i wstrzymywania leczenia [49,51].

Zasadniczym celem leczenia jest eradykacja zakażenia HBV i wywołanie remisji aktywności chorób wątroby. W praktyce aktualny stan wiedzy i możliwości terapeutycznych powoduje, iż jest ona do tej pory nieosiągalna. Przyczyną tej trudności jest epiosomalna struktura HBV-DNA, która wykazuje znaczącą odporność na wskazane preparaty farmaceutyczne stosowane w leczeniu zakażeń HBV. Przetwanie powyższej struktury skutkuje wznowieniem zakażenia [52]. W konsekwencji możliwym jest jedynie uzyskanie trwałego zaniku HBV-DNA w surowicy. Potwierdzeniem zahamowania replikacji HBV jest wynik przeprowadzonego testu reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) o wysokiej czułości [48]. Pozytywnymi rezultatami supresji replikacji HBV są:

- ✚ wstrzymanie procesów włóknienia tkanek wątroby i cofanie się zmian już powstałych,
- ✚ stabilizacja wyników badań biochemicznych prób wątrobowych,
- ✚ ograniczenie rozwoju i zachorowalności na HCC,
- ✚ ograniczenie ryzyka rozwoju niewydolności wątroby,
- ✚ wydłużenie życia pacjentów i poprawa jakości ich życia,
- ✚ minimalizowanie rozprzestrzeniania się HBV, redukcja zakaźności osób zainfekowanych [48].

Efektywność leczenia oceniana jest poprzez różne rodzaje odpowiedzi organizmu na zastosowaną terapię przeciwwirusową. W celu normalizacji otrzymywanych wyników zdefiniowana została nomenklatura umożliwiająca porównywanie skuteczności leczenia, czyli:

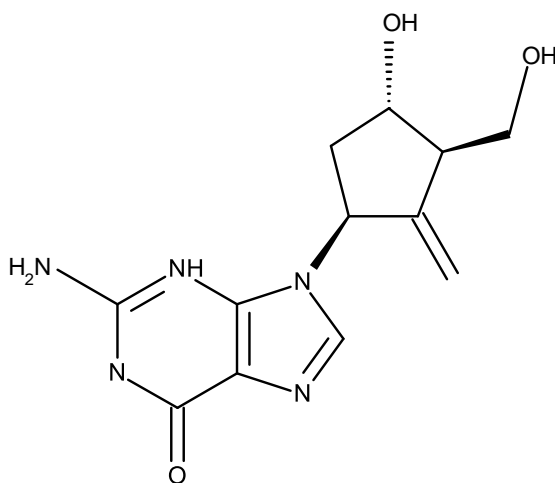
- ✚ odpowiedź wirusologiczna – redukcja poziomu wirerii do wartości niewykrywalnych przez obecnie dostępne testy,
- ✚ odpowiedź biochemiczna – normalizacja poziomu ALT w surowicy krwi pacjenta,
- ✚ odpowiedź histologiczna – poprawa wskaźników aktywności zapalnej lub wskaźników zwłóknienia,
- ✚ odpowiedź serologiczna - występowanie serokonwersji,

- odpowiedź całkowita – odpowiedź definiuje się jako utratę HBsAg i wytworzenia przeciwciał anty-HBs [47,49,53].

## 2.4. Entekawir – podstawowe informacje

Entekawir (ENT), którego wzór strukturalny przedstawia rycina 6, jest analogiem nukleozydu guanozyny i występuje pod nazwą systematyczną 2-amino-9-[(1S,3R,4S)-4-hydroksy-3-(hydroksymetylo)-2-metylidencyklopentylo]-6,9-dihydro-3H-puryno-6-on. Wykorzystuje się go jako lek przeciwwirusowy w leczeniu WZW B, a także stosuje w terapii po transplantacji wątroby [54]. ENT został przypisany jako lek pierwszego rzutu, aby zapobiegać rozwijaniu i zaostrzaniu istniejącego już przewlekłego WZW B [55]. Mechanizm działania ENT polega na hamowaniu trzech funkcji polimerazy DNA HBV, takich jak: promowanie polimerazy DNA HBV, synteza nici dodatniej DNA HBV i odwrócenie transkrypcji nici ujemnej [56,57]. Ponieważ ENT jest wydalany głównie przez nerki, jednoczesne podawanie ENT z lekami, które zmniejszają czynność nerek lub konkurują o aktywne wydzielanie kanalikowe, może zwiększać stężenie ENT bądź jednocześnie podawanego leku [58].

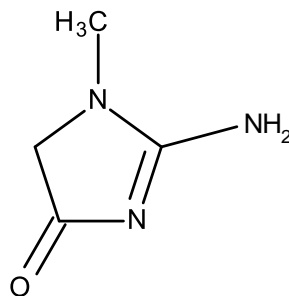
Dawka ENT zależy od czynności nerek. U pacjentów z zaburzeniami czynności nerek należy dostosować dawkę leku i monitorować odpowiedź wirusologiczną organizmu. Podczas terapii ENT możliwe jest również zaostrzenie zapalenia wątroby. Zwykle obserwuje się to około 4.-5. tygodni po rozpoczęciu leczenia u pacjentów z marskością wątroby i u pacjentów z niewyrównaną marskością wątroby. Z uwagi na to, funkcje wątroby i nerek powinny być regularnie monitorowane podczas leczenia i co najmniej 6 miesięcy po jego zakończeniu [59].



Ryc. 6. Wzór strukturalny entekawiru (ENT).

### 3. KREATYNINA – BIOCHEMICZNY MARKER OCENY FUNKCJONOWANIA NEREK

Kreatynina (Crn) jest związkiem azotowym i stanowi produkt metabolizmu kreatyny, głównego składnika tworzącego tkankę mięśniową (Ryc. 7). Kreatyna odpowiada za składowanie i dostarczanie energii w komórkach mięśniowych. Została odkryta przez Michaela Eugenia Chevereula w 1832 roku i jest syntetyzowana w organizmie z aminokwasów głównie w wątrobie, trzustce i nerkach. Kreatyna jest również dostarczana w diecie z produktów pochodzenia zwierzęcego. Organizm człowieka zawiera wszystkie enzymy potrzebne do biosyntezy kreatyny, a pokarm nie jest jej absolutnym źródłem pochodzenia. Powoduje to, że kreatyna nie jest uważana za niezbędny składnik odżywczy w diecie [60,61].



**Ryc. 7.** Wzór strukturalny kreatyniny.

Crn to produkt odpadowy powstający w mięśniach w wyniku naturalnej, spontanicznej degradacji fosforanu kreatyny, wysokoenergetycznego związku magazynującego. Występuje w surowicy krwi oraz w moczu. Szybkość jej metabolizmu jest stała, a około 2% kreatyny dziennie przekształcane jest w Crn [62]. W prawidłowo funkcjonującym organizmie, Crn niemalże w całości usuwana jest z krwi do moczu na drodze filtracji w kłębuszkach nerkowych. Normy występowania Crn w surowicy i moczu różnią się w zależności od płci oraz masy mięśniowej. W surowicy krwi zakres referencyjny dla mężczyzn wynosi 0,7-1,3 mg dl<sup>-1</sup>, zaś dla kobiet 0,6-1,1 mg dl<sup>-1</sup>. W przypadku moczu od 7 do 13 mmol l<sup>-1</sup> dla kobiet oraz od 10 do 18 mmol l<sup>-1</sup> dla mężczyzn [63]. Nieprawidłowe jej wartości mogą świadczyć o zaburzeniu pracy nerek. Istnieje wiele możliwych przyczyn wysokiego poziomu Crn. Wyniki odbiegające od normy, które występują pojedynczo, chwilowo utrudniając pracę nerek spowodowane są najczęściej odwodnieniem organizmu, suplementacją kreatyną, bądź przyjmowaniem dużej ilości białka wraz z pokarmem. Stale utrzymujące się wysokie poziomy Crn mogą



wskazywać na zły stan zdrowia organizmu. Wiele schorzeń może powodować uszkodzenia lub choroby wpływające na czynność nerek. Są to m.in.: kłębuszkowe zapalenie nerek, cukrzyca, choroby serca, zakażenie nerek, zablokowanie dróg moczowych, ostra i przewlekła niewydolność nerek oraz nefrotoksyczność polekowa [64]. Zbyt niskie jej poziomy mogą świadczyć o chorobie mięśni, takiej jak dystrofia mięśniowa, zanik mięśni, a ponadto niedożywieniu, chorobach wątroby oraz nadmiernej utracie wody. Ponieważ rozpad tkanki mięśniowej powoduje produkcję kreatyniny, u osób z małą masą mięśniową często występuje niski poziom kreatyniny. Tak więc jej mała wartość nie zawsze oznacza poważny problem medyczny [65].

Stopień wydalania Crn z organizmu zależy od wielu czynników m.in. wieku, płci, rasy, zawartości mięsa w diecie, masy mięśniowej, przyjmowanych leków, czy aktywności fizycznej. Crn stanowi bardzo dobry biochemiczny wskaźnik zaburzeń i chorób nerek, ponieważ usuwana jest z organizmu tylko i wyłącznie na drodze filtracji kłębuszkowej i częściowego wydalania kanalikowego [64].

Istotnym parametrem, który charakteryzuje wydolność nerek jest szacowany współczynnik filtracji kłębuszkowej (eGFR). Wskaźnik ten dostarcza informacji na temat ilości oczyszczonego osocza z danej substancji w określonej jednostce czasu przez kłębuszki nerkowe do moczu pierwotnego. Klincznym standardem wyliczania eGFR jest określenie klirensu endogennej Crn. Wzrost zawartości Crn we krwi może oznaczać: zaburzenia w funkcjonowaniu nerek, niewydolność nerek, zablokowanie dróg moczowych lub odwodnienie [63,66].

Crn wydalana jest z moczem ze stałą ilością ok. 25 mg na kg masy ciała dziennie. Ze względu na tę szczególną fizjologiczną właściwość, Crn w moczu jest używana od kilkudziesięciu lat do korygowania szybkości wydalania lub zawartości w moczu wielu substancji endogennych i egzogennych. Korekta ta jest niezbędna w badaniach klinicznych i zawodowych, w których najczęściej do analiz wykorzystywane są próbki moczu. Ze względu na nieinwazyjny sposób pobierania próbki i dostępność odpowiednich ilości materiału w biomonitoringu człowieka, mocz jest jedną z najbardziej preferowanych matryc służących do weryfikacji stanu zdrowia, monitorowania skuteczności terapii, oceny funkcjonowania nerek lub określenia stopnia narażenia na zanieczyszczenia środowiskowe.

Istnieje wiele metod ilościowych służących do pomiaru stężenia Crn w moczu i surowicy krwi człowieka. Standardowo wykorzystywana jest kolorymetryczna metoda Jaffe'go opracowana w 1886 roku oparta na reakcji kreatyniny z kwasem pikrynowym

w środowisku alkalicznym. Utworzony kompleks o czerwonym zabarwieniu jest mierzony przy długości fali 505 nm. Główną wadą tej metody jest interferencja innych związków takich jak bilirubina, białka i ketony [62,67].

Bardzo popularną techniką wykorzystywaną do oznaczania zawartości Crn w moczu jest również HPLC. Jeden z protokołów został opracowany w Katedrze Chemii Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego. W metodzie tej nie ma potrzeby przeprowadzania żadnych reakcji chemicznych, a próbka moczu jest jedynie rozcieńczana i analizowana w odwróconym układzie faz z wykorzystaniem detektora UV [68].

## **4. CHARAKTERYSTYKA PŁYNÓW BIOLOGICZNYCH**

Analiza płynów ustrojowych odgrywa kluczową rolę w diagnostyce i prognozowaniu choroby. Ludzkie płyny biologiczne są uważane za ważne źródła markerów klinicznych. Skład chemiczny jest szczególnie istotny przy ocenie roli określonego płynu w utrzymaniu zdrowia, komfortu i dobrego samopoczucia pacjenta. Zmiana stężenia bądź składu określonego składnika biochemicznego w płynach ustrojowych jest wykorzystywana jako wskaźnik stanu fizjologicznego lub patologicznego. Tym samym analiza płynów ustrojowych człowieka stała się jednym z najbardziej obiecujących podejść do odkrywania biomarkerów i mechanizmów patofizjologicznych chorób człowieka. Wykrycie takich markerów na wczesnym etapie może prowadzić do szybkiej diagnozy, która w konsekwencji może skutkować odpowiednim leczeniem. Monitorowanie określonych substancji podczas przebiegu choroby, związku endogennego lub egzogenego, może również dać wgląd w skuteczność określonej terapii [69].

Zalety badania płynów ustrojowych obejmują niską inwazyjność, mały koszt oraz szybkie pobieranie i przetwarzanie próbek w porównaniu do tkanek. Analiza płynów ustrojowych człowieka jest z natury trudna ze względu na ich unikalne cechy i złożoność biologiczną. W poniższym rozdziale skupiono się na omówieniu trzech matryc biologicznych, które zostały wykorzystane w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

### **4.1. Mocz**

Mocz jest ważnym i łatwo dostępnym płynem biologicznym, który już od ponad 100 lat był przedmiotem szczegółowych analiz chemicznych. Badanie ogólne moczu należy do podstawowych testów diagnostycznych wykorzystywanych w praktyce klinicznej. Sposób jego pobierania nie jest zbyt skomplikowany, w porównaniu

z pobieraniem np. próbek krwi. Próbką moczu, a najważniejsze jej skład, jako narzędzie diagnostyczne w chemii klinicznej może być stosowane do monitorowania leczenia chorób, oceny jakościowej i ilościowej wydalania leków i ich metabolitów, a także do oceny narażenia na czynniki środowiskowe.

Mocz jest przezroczystym płynem o słomkowym kolorze, zawierającym szkodliwe i niepotrzebne dla organizmu pozostałości przemiany materii. Tętnica nerkowa doprowadza do nerki krew z mocznikiem, nadmiarem wody oraz innymi zbędnymi i szkodliwymi substancjami, a mocz jest produkowany na drodze filtracji krwi w kłębuszkach nerkowych. Następnie dochodzi do resorpcji moczu macierzystego (wchłonięcie do krwi cennych dla organizmu substancji) do kanalików nerkowych. Z kanalików nerkowych wypływa mocz ostateczny i przedostaje się do kanalików zbiorczych. Kolejno z miedniczek nerkowych poprzez moczowody dostaje się do pęcherza i stamtąd wydalany jest poprzez cewkę moczową [70].

Mocz to głównie woda (około 95%), a także rozpuszczalne odpady pochodzące z krwioobiegu, mocznik - pochodzący z metabolizmu aminokwasów, jony soli nieorganicznych, w tym jony chlorkowe, sodowe, potasowe, cukry, oraz barwny produkt rozkładu hemoglobiny - urobilina, która daje mu charakterystyczny kolor. Przeciętna osoba dorosła wytwarza dziennie od 1,5 do 2,0 litrów moczu [71,72]. W tabeli 2 zaprezentowano podstawowe parametry moczu charakterystyczne dla zdrowego człowieka.

**Tabela 2.** Charakterystyczne parametry moczu zdrowego człowieka [71,73].

<b>Parametr</b>	<b>Opis</b>
<b>Barwa</b>	słomkowa
<b>Odczyn</b>	słabo kwaśny – słabo zasadowy (4,5 – 8,0)
<b>Białka</b>	nieobecne
<b>Głukoza</b>	nieobecna
<b>Bilirubina</b>	nieobecna
<b>Urobilinogen</b>	obecny
<b>Azotany</b>	nieobecne
<b>Erytrocyty</b>	0-2 w polu widzenia
<b>Leukocyty</b>	0-5 w polu widzenia
<b>Objętość na dobę</b>	1,5 – 2,0 l
<b>Ciężar właściwy</b>	Od 1005 – 1030 kg l <sup>-1</sup>

Mocz do analizy pobiera się do jednorazowych, sterylnych pojemników z wieczkiem bądź nasadką zapobiegającą utracie bądź zanieczyszczeniu próbki. Materiał, z którego wykonany jest pojemnik nie powinien reagować z żadnym analitem poddawanyemu oznaczeniu oraz nie powinien go absorbować.

Pobieranie i analiza próbek moczu nie jest związana z ryzykiem przeniesienia chorób zakaźnych, a uzyskana wielkość prób może być stosunkowo duża, nawet około 0,8 litra [74]. Mocz jest jedną z bardziej skomplikowanych matryc wykorzystywanych w analityce. Związane jest to z różnorodnością substancji w nim występujących. Zawartość składników moczu uzależniona jest od stanu zdrowia człowieka, diety, prowadzonego stylu życia oraz ilości przyjmowanych płynów, które bezpośrednio wpływają na rozcieńczenie moczu. Wszystkie te czynniki determinują to, iż wykrywanie i oznaczanie określonych substancji w moczu często sprawia wiele trudności. Stąd też w analityce próbek moczu szeroko stosowane są techniki separacyjne [75].

Czas pobrania, zatężenie i natężenie przepływu moczu wpływają na zawartość związków w nim występujących. Problem ten można jednak łatwo rozwiązać dzięki normalizowaniu rozcieńczenia próbek w odniesieniu do stężenia kreatyniny w moczu. Podstawowym założeniem dla tego podejścia jest to, że współczynnik wydalania dobowego kreatyniny w moczu przez nerki jest stały dla danej osoby i proporcjonalny do masy mięśniowej, z bardzo małą zmiennością w ramach osoby, jak i między osobami, dlatego może być ona uważana za związek referencyjny [76].

W analizie klinicznej podstawowymi parametrami określanymi w moczu są: ciężar właściwy, przejrzystość, kolor, odczyn pH, ilość białek, cukrów, ciał ketonowych i barwników żółciowych. Obecność cukrów może świadczyć o występowaniu cukrzycy, a białek o zaburzeniu pracy wątroby. Bardziej specjalistyczne badania obejmują wyznaczenie ilości nabłonków, wałeczków, krwinek białych i czerwonych. Obecność wałeczków i nabłonków może sugerować chorobę, a nawet uszkodzenie nerek [77,78].








W próbkach moczu można zaobserwować obecność różnorodnych związków chemicznych, w tym ksenobiotyków i biomarkerów. Badanie te mogą pomóc w ustalaniu źródła pochodzenia związków chemicznych potencjalnie szkodliwych dla człowieka, np. zanieczyszczone powietrze, woda bądź żywność [79].

## 4.2. Krew

Krew to płyn, który jest technicznie uważany za tkankę łączną. Jest to macierz zewnątrzkomórkowa, w której komórki krwi są zawieszone w osoczu. Zwykle ma ona pH około 7,4 i jest nieco gęstsza i bardziej lepka niż woda. W jej skład wchodzi morfolityczne elementy krwi: erytrocyty (krwinki czerwone), leukocyty (krwinki białe) i trombocyty (płytki krwi). Objętościowo krwinki czerwone stanowią około 45% krwi pełnej, osocze około 54,3%, krwinki białe około 0,7%, a płytki krwi stanowią mniej niż 1% [80,81]. W tabeli 3 zaprezentowano podział i charakterystykę morfolitycznych elementów krwi. Wszystkie elementy wytwarzane są w układzie krwionośnym, w skład którego wchodzi szpik kostny czerwony, węzły chłonne, grasica, śledziona i migdałki [82]. Krew umożliwia transport komórek i cząsteczek między częściami ciała, a więc jest niezbędnym łącznikiem pomiędzy wszystkimi komórkami organizmu. Tlen, dwutlenek węgla i glukoza należą do najważniejszych cząsteczek transportowanych we krwi. Komórki krwi są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania układu metabolicznego i odpornościowego [80]. Charakterystyczny kolor nadaje hemoglobina, unikalne białko zawierające żelazo, znajdująca się w erytrocytach. Hemoglobina rozjaśnia kolor krwi po nasyceniu tlenem (oksyhemoglobina) i powoduje jej ciemnienie po usunięciu tlenu (dezoksyhemoglobina). Z tego powodu częściowo odtleniona krew z żyły jest ciemniejsza niż natleniona z tętnicy. W organizmie krew jest stale płynna, a przepływ turbulentny zapewnia, że komórki i osocze są dość jednorodnie wymieszane. Ciągły przepływ utrzymuje stałe środowisko dla komórek ciała. Objętość krwi i stężenie jej wielu składników są utrzymywane w wąskich granicach przez mechanizmy homeostatyczne [83,84]. Krew stanowi około 7% masy ciała (5,6 litra u osoby o wadze 70 kg). Udział procentowy jest mniejszy u kobiet i znacznie większy u dzieci, ale stopniowo maleje, aż do osiągnięcia dorosłości [84].

Czerwone krwinki są zdecydowanie najbardziej rozpowszechnionym typem krwinek i produkowane są w czerwonym szpiku kostnym. Posiadają kształt dwuwklęsłych dysków, nie zawierają jądra, a ich średnica wynosi około 7  $\mu\text{m}$ . Ich najważniejszą funkcją jest transport gazu, głównie tlenu, ale przenoszą również pewną ilość dwutlenku węgla. Ich charakterystyczny kształt jest dostosowany do ich przeznaczenia. Dwuwklęsłość zwiększa ich powierzchnię wymiany gazowej. Komórki te są elastyczne, dzięki czemu mogą przeciskać się przez wąskie naczynia [84].

**Tabela 3.** Podział i charakterystyka morfotycznych elementów krwi [81].

Typ komórki	Rysunek	Opis	Komórki (mm <sup>3</sup> ) krwi	Okres rozwoju (OR) i czas życia (CZ)	Funkcje
Eryocyty (czerwone komórki krwi)		dwuwklęsły, bezjądrowy dysk, średnica 7-8 μm	4-6 milionów	OR: około 15 dni CZ: 100-120 dni	transport tlenu i dwutlenku węgla
Leukocyty (białe komórki krwi)		kuliste komórki jądrzaste	4800-10800		
<b>Granulocyty</b>					
Neutrofile		jądro wielopłaszczyznowe; niepozorne granulki cytoplazmatyczne; średnica 10-12 μm	3000-7000	OR: około 14 dni CZ: od 6 godzin do kilku dni	fagocytizują bakterie
Eozynofile		jądro dwupłatowe; czerwone granulki cytoplazmatyczne; średnica 10-14 μm	100-400	OR: około 14 dni CZ: około 5 dni	zabijają pasożyty, odgrywają złożoną rolę w alergii i astmie
Bazofile		jądro dwupłatowe; duże fioletowo-czarne granulki cytoplazmatyczne; średnica 10-14 μm	20-50	OR: od 1 do 7 dni CZ: od kilku godzin do kilku dni	uwalniają histaminę i inne mediatory zapalenia; zawierają heparynę, antykoagulanty
<b>Agranulocyty</b>					
Limfocyty		jądro kuliste; bładoniebieska cytoplazma; średnica 5-17 μm	1500-3000	OR: od dni do tygodni CZ: od dni do lat	wzmacniają odpowiedź immunologiczną poprzez bezpośredni atak komórkowy lub przeciwciała
Monocyty		jądro w kształcie litery U lub nerki; szaro-niebieska cytoplazma; średnica 14-24 μm	100-700	OR: 2-3 dni CZ: miesiące	fagocytoza; rozwijają się w makrofagi w tkankach
Płytki krwi		tarczowe fragmenty cytoplazmatyczne zawierające granulki; ciemnofioletowe; średnica 2-4 μm	150000-400000	OR: 4-5 dni CZ: 5-10 dni	uszczelniają małe rany w naczyniach krwionośnych; odgrywają rolę w krzepnięciu krwi

Leukocyty, czyli białe krwinki to jedyne utworzone elementy, które są kompletnymi komórkami, z jądrem i organellami. Leukocyty są znacznie mniej liczne niż czerwone krwinki i mają kluczowe znaczenie dla naszej obrony przed chorobami. Wraz z narządami limfatycznymi są odpowiedzialne za odporność organizmu, a ich

głównym zadaniem jest wyszukiwanie i niszczenie niebezpiecznych drobnoustrojów: bakterii, wirusów i pasożytów oraz toksyn i komórek nowotworowych, dzięki czemu mają pewne szczególne cechy funkcjonalne. Czerwone krwinki są ograniczone do krwiobiegu i pełnią swoje funkcje we krwi. Białe krwinki są w stanie wydostać się z naczyń włosowatych, a układ krążenia jest ich środkiem transportu do obszarów ciała (głównie luźnych tkanek łącznych lub limfoidalnych), gdzie są potrzebne do wywołania odpowiedzi immunologicznej [84]. Leukocyty magazynowane są w szpiku kostnym, węzłach chłonnych i śledzionie, a dopiero w sytuacji zagrażającej zdrowiu bądź życiu organizmu transportowane są do krwiobiegu i mogą spełniać funkcje ochronne. Zwykle rosnąca liczba białych krwinek we krwi wskazuje na problem fizjologiczny, np. infekcję czy uraz. Istnieją dwa główne typy leukocytów:

- ✚ granulocyty – (neutrofile, eozynofile i bazofile),
- ✚ agranulocyty – (monocyty i limfocyty).

Trombocyty, czyli płytki krwi, są to małe fragmenty cytoplazmy oderwane od komórek megakariocytów szpiku [85]. Chociaż nie mają jądra, ich cytoplazma jest wypełniona granulami zawierającymi różne substancje sprzyjające krzepnięciu krwi (koagulacji) [84]. Ponadto uczestniczą w stymulacji wzrostu fibroblastów, stymulują rozwój komórek mięśni gładkich, a także odpowiadają za proces fibrynolizy [85]. Płytki krwi są produkowane w tempie 200 miliardów dziennie, jednak mechanizmy regulujące liczbę płytek krwi nie są w pełni poznane [80,84]. Hormon trombopoetyna pochodzący z wątroby stymuluje produkcję płytek krwi [84]. Lepka powierzchnia płytek krwi pozwala im gromadzić się w miejscu pękniętych naczyń krwionośnych, tworząc skrzep, częściowo z powodu uwolnienia czynników krzepnięcia, które występuje podczas uszkodzenia śródbłonna naczyń krwionośnych. Ten proces nazywa się hemostazą. Płytki krwi wydzielają czynniki, które zwiększają lokalną agregację płytek krwi (np. tromboksan A), zwiększają skurcz naczyń (np. serotonina) i sprzyjają krzepnięciu krwi (np. tromboplastyna, fibrynogen). Płytki krwi są niezwykle ważne dla gojenia się ran, które może nastąpić dopiero po utworzeniu się skrzepu i całkowitym ustaniu krwawienia. Żywotność płytek krwi wynosi od 5 do 10 dni, a te, które nie są używane do hemostazy, są niszczone przez makrofagi, głównie w śledzionie. Około jedna trzecia płytek krwi jest przechowywana w śledzionie, która stanowi „magazyn awaryjny”, umożliwiający w razie potrzeby opanowanie nadmiernego krwawienia [80,84].

Zasadniczym składnikiem krwi, w którym są zawieszone elementy morfotyczne jest osocze. Stanowi ono około 55% całkowitej objętości krwi i otrzymywane jest poprzez

odwirowanie krwi pełnej. Pomimo, iż około 90% stanowi woda, osocze, podobnie jak mocz, uważane jest za jeden z najbardziej skomplikowanych materiałów biologicznych wykorzystywanych w analityce. Związane jest to z obecnością w tym płynie m.in. białek, lipoprotein, kwasów tłuszczowych, hormonów, glukozy, produktów metabolizmu białek, w tym mocznika i aminokwasów [84,86]. Osocze pełni funkcję transportera i dostarcza metabolity do nerek, płuc i wątroby. Wspomaga regulację ciśnienia krwi, a także odpowiada za utrzymanie podstawowej temperatury ciała. Białka osocza uczestniczą w regulacji równowagi kwasowo-zasadowej, ciśnienia osmotycznego oraz lepkości osocza [87,88].

Krew oraz mocz są materiałami biologicznymi w porównywalnym stopniu wykorzystywanymi do badań. Niestety, badanie zawartości związków we krwi może być bolesne dla pacjenta i niesie za sobą ryzyko przeniesienia chorób na personel medyczny, co związane jest z inwazyjnym procesem uzyskania próbki [89]. Morfologia krwi jest podstawowym badaniem umożliwiającym określenie stanu zdrowia, pozwala wykryć stany zapalne, zatrucia oraz procesy chorobowe zachodzące w organizmie [80]. Ilościowe oznaczenie glukozy we krwi jest niezbędne do rozpoznania cukrzycy, w której poziom tego cukru we krwi wynosi powyżej  $100 \text{ mg dl}^{-1}$  na czczo [83,90]. Azotowe produkty przemiany materii, w szczególności mocznik, mają tendencję do gromadzenia się u osób z chorymi nerkami, które nie są w stanie wydaląć tych substancji w normalnym tempie. Wzrost stężenia bilirubiny w surowicy często odzwierciedla zaburzenie wątroby i dróg żółciowych lub zwiększoną szybkość niszczenia hemoglobiny [83].







W zależności od rodzaju przeprowadzanych badań, materiałem analitycznym może być krew pełna, która posiada płynne i morfotyczne elementy krwi, a także osocze bądź surowica. Krew może być pobierana do suchych, sterylnych probówek, w których możliwe jest powstanie skrzepu i oddzielenie surowicy, a także do specjalnych probówek, które zawierają substancje przyspieszające bądź hamujące jego powstawanie. Zastosowanie probówek z dodatkiem antykoagulantów powstrzymuje proces krzepnięcia, dzięki czemu możliwe jest przeprowadzanie analiz dla krwi pełnej oraz dla osocza uzyskanego po jej odwirowaniu w określonym czasie i przy określonej liczbie obrotów [73,91]. Badania biochemiczne wykonywane są najczęściej na surowicy bądź osoczu, hematologiczne na krwi pełnej, serologiczne dla surowicy i krwi pełnej oraz koagulologiczne dla osocza [73].

W zależności od rodzaju zastosowanego antykoagulantu lub aktywatora wykrzepiania próbówki, do których pobierana jest krew różni się kolorem korka.



W tabeli 4 zaprezentowano przykładowe zestawienie kolorystyczne z odpowiednim rodzajem substancji w zależności od wykonywanego badania.

**Tabela 4.** Kolorowe oznaczenia odpowiadające międzynarodowym standardom [92].

Kolor korka	Rodzaj substancji	Wskazania
Jasno niebieski 	Cytnian sodu 3,2%	Do oznaczeń parametrów koagulologicznych w osoczu
Czarny 	Cytnian sodu 3,8%	Do oznaczenia szybkości opadania erytrocytów
Czerwony 	Aktywator wykrzepiania	Do oznaczeń parametrów chemicznych w surowicy
Zielony 	Heparyna sodowa lub litowa	Do oznaczeń parametrów chemicznych w osoczu
Lawendowy 	EDTA	Do oznaczeń parametrów hematologicznych w krwi pełnej
Szary 	Fluorek sodu i heparyna sodowa bądź fluorek sodu i EDTA	Do oznaczeń poziomu glukozy

### 4.3. Ślina

Wczesne wykrycie choroby ma nie tylko zasadnicze znaczenie dla złagodzenia jej przebiegu i zapobiegania powikłaniom, ale także ma kluczowe znaczenie dla zwiększenia wskaźnika skuteczności terapii [93].

Współczesne metodologie wczesnej diagnozy klinicznej wykorzystują głównie analizę płynów biologicznych, przede wszystkim krwi, osocza oraz moczu, które zwane są „złotymi standardami” nauk medycznych. W ciągu ostatnich dziesięcioleci ślina jest także przedmiotem analiz. Powodem jest fakt, że posiada ona wiele wyraźnych zalet jako próbka diagnostyczna w porównaniu do krwi [94]. Najważniejsza korzyść to powszechna dostępność materiału biologicznego i łatwość pobierania, które może odbywać się w sposób nieinwazyjny i przy zminimalizowaniu ryzyka zakażenia personelu medycznego. W tym wypadku nie jest konieczne pobieranie próbek przez przeszkolony personel medyczny. Próbki śliny mogą być pobrane w domu przez samego pacjenta, o każdej porze dnia bez konieczności wykorzystywania specjalistycznego sprzętu, co znacznie zmniejsza dyskomfort związany z pobieraniem krwi [95]. Transport, przechowywanie materiału biologicznego oraz procedury diagnostyczne w analizie śliny są mniej wymagające w porównaniu z surowicą [94-96].

Ślina była intensywnie badana jako potencjalne narzędzie diagnostyczne także ze względu na bogactwo biomarkerów, takich jak materiał genetyczny i białka [96]. Większość związków występujących we krwi jest również obecna w ślinie, a zatem ślina jest funkcjonalnym odpowiednikiem surowicy, odzwierciedlającym stan fizjologiczny organizmu, w tym zmiany hormonalne, żywieniowe i metaboliczne [95]. Co więcej, ślina z diagnostycznego punktu widzenia stanowi mniej skomplikowaną matrycę niż krew czy mocz. Zawartość białek jest około 10 - 15 razy niższa w porównaniu z osoczem. Redukuje to ryzyko wiązania analitów z cząsteczkami białek oraz upraszcza proces obróbki próbki przed analizą, wpływając korzystnie na obniżenie kosztów badań.

Ślina jest lekko kwaśną cieczą wydzielaną przez trzy główne gruczoły ślinowe oraz liczne mniejsze gruczoły zlokalizowane w całej jamie ustnej. Udział większych i mniejszych gruczołów ślinowych w wydzielaniu śliny jest następujący:

- ✚ 20% ślinianki przyuszne,
- ✚ 65–70% ślinianki podżuchwowe,
- ✚ 7–8% ślinianki podjęzykowe,
- ✚ <10% mniejsze gruczoły ślinowe.

Surowicze wydzieliny są wytwarzane głównie przez śliniankę przyuszną i są bogate w jony i enzymy. Wydzieliny śluzowe są wytwarzane głównie przez drobne gruczoły ślinowe, są bogate w glikoproteiny i wykazują niewielką aktywność enzymatyczną lub jej brak. Mieszane wydzieliny są wytwarzane głównie przez ślinianki podżuchwowe i podjęzykowe, a zawartość śliny zależy od proporcji między komórkami surowiczymi i śluzowymi.

Ślina jest substancją wodnistą, składającą się z 99,5% wody i 0,5% substancji organicznych i nieorganicznych. Dzienna produkcja śliny waha się od 0,75 do 1,5 l, przy średnim natężeniu przepływu 0,1–0,3 ml min<sup>-1</sup>. Uwarunkowania takie jak ogólny stan zdrowia, przyjmowanie leków, sposób higieny jamy ustnej, czy wzmożony wysiłek fizyczny, wywierają wpływ na jakość wydzielanej śliny [94,97]. Normalny poziom pH śliny mieści się w przedziale 6,5–7,5, a jej gęstość wynosi 1,0012 g cm<sup>-3</sup>. Składniki organiczne śliny pochodzą z białek i są to: glikoproteiny (mucyny), białka bogate w prolinę, amylazę, lipazę, a także sialoperoksydaza, lizozym, laktoferryna, chitynaza, cystatyny, histatyny, defensyny, inhibitory proteazy leukocytów śliny, kalprotektyna, peroksydaza, kwaśna fosfataza, chromogranina A i aglutynina. W skład części nieorganicznej wchodzi: jony sodu, potasu, chloru, wodorowęglany, jony magnezu, jony

wapnia, fosforany, tiocyjaniany, fluorki, jony ołowiu, kadmu, miedzi, azotany(III) i azotany(V) [97].

Istnieją dwie metody zbierania próbek śliny, które można sklasyfikować w zależności od tego, czy wykorzystują bodźce. Ślina stymulowana zwykle zbierana jest w trakcie żucia gumy, co zwiększa szybkości jej wydzielania. Ta metoda wpływa zarówno na ilość wyprodukowanego materiału biologicznego jak i pH śliny. Wykorzystywana jest u pacjentów, którzy mają trudności z wytworzeniem wystarczającej ilości śliny. Ślina niestymulowana jest pobierana bez żadnych bodźców zewnętrznych, a na natężenie jej przepływu największy wpływ ma stopień nawodnienia organizmu. Trzy najczęstsze metody zbierania niestymulowanej śliny to odsączanie, płucie i odsysanie. To, czy ślina jest stymulowana, czy niestymulowana, znajduje odzwierciedlenie w zmiennym charakterze proporcji śliny w głównych gruczołach ślinowych oraz stężeniu niektórych białek, jonów i wody. Uważa się, że niestymulowana ślina reprezentuje próbkę obojętną, na którą gruczoły ślinowe mają mniejszy wpływ, jednak sugeruje się również, że ślina stymulowana może pozwolić na dokładniejsze wykrywanie biomarkerów np. raka [98].

Zawartość śliny może ulec zmianie w wyniku procesów fizjologicznych zachodzących w różnych momentach dnia, a także pod wpływem bodźców w jamie ustnej. Z tego względu bardzo często pacjenci instruowani są o powstrzymaniu się od jedzenia, picia i higieny jamy ustnej, przez różne okresy przed pobraniem próbek. Aby dane były miarodajne, ślina musi być pobierana w znormalizowanych warunkach ze względu na obecność rytmów okołodobowych w szybkości wydzielania śliny i na jej skład [99]. Przed pobraniem śliny należy wskazać pacjentowi, aby wyczyścił jamę ustną jedynie przez dokładne przepłukanie ust wodą [95]. Jej szybkie i proste pobieranie daje możliwość monitorowania stanu zdrowia niemowląt, dzieci lub osób starszych, bez konieczności ingerowania w organizm.

Ślina pełni wiele funkcji, które obejmują naprawę tkanek, nawilżenie, utrzymanie integralności szkliwa zębów, ochronę przeciwbakteryjną i przeciwwirusową, utrzymanie integralności błony śluzowej, rozcieńczanie i oczyszczanie, zdolność buforowania, remineralizację, przygotowywanie pokarmu do połykania, trawienie, smakowanie pokarmu [97,100].

W ostatnich dekadach opracowano metody diagnostyki śliny do monitorowania chorób jamy ustnej, takich jak choroby przyzębia [101] oraz oceny ryzyka próchnicy [102]. Ostatnie badania pokazały, że wraz z rozwojem biotechnologii rozwinęła się

również diagnostyka oparta o ślinę, która już nie tylko służy do monitorowania chorób jamy ustnej, ale również do monitorowania jakości funkcjonowania całego organizmu. Dotyczy to zarówno śledzenia zmian metabolicznych jak i wykrywania oraz monitoringu biomarkerów chorób. W ślinie znajduje się duża liczba medycznie cennych analitów, które reprezentują biomarkery chorób nowotworowych [103], autoimmunologicznych – zespołu Sjögren'a [104], mukowiscydozy [105], jak również zakażenia HIV [106]. Co więcej, istnieje coraz więcej informacji na temat zastosowania śliny w diagnostyce chorób układu sercowo-naczyniowego [107] oraz cukrzycy [108]. Postępy te wskazują na obiecującą przyszłość diagnostyki śliny w spersonalizowanych zastosowaniach w medycynie indywidualnej i prognozowaniu wyników leczenia [96,100].

Biorąc pod uwagę dokładność, skuteczność, prostotę i czynniki ekonomiczne, testy diagnostyczne śliny stają się coraz bardziej popularne w naukach medycznych. Co więcej, techniki diagnostyczne oparte o wykorzystanie próbek śliny mogą potencjalnie umożliwić badania przesiewowe całej populacji w kierunku konkretnej choroby w określonym czasie.

Pandemia wirusa SARS-CoV-2 obecnie jest największym globalnym kryzysem zdrowotnym. Szybka i precyzyjna diagnoza w kierunku Covid-19 ma kluczowe znaczenie w kontrolowaniu epidemii na całym świecie. Wymazy pobierane z nosogardzieli, jamy ustnej oraz gardła są zalecanymi typami próbek do badań w kierunku diagnozy zakażenia Covid-19. Zatem pobieranie próbek do analizy wymaga osobistego kontaktu pracowników służby zdrowia z potencjalnie zakażonymi osobami. Stwarza to duże ryzyko przenoszenia wirusa poprzez personel medyczny, a także powoduje ból i dyskomfort odczuwany przez pacjentów w trakcie pobierania wymazów. Pobieranie śliny jest procedurą nieinwazyjną, a także znacząco minimalizuje ryzyko zakażenia pracowników służby zdrowia wirusem SARS-CoV-2. Dane literaturowe wskazują, iż ślina ma wysoki wskaźnik spójności przekraczający 90% z próbkami z jamy nosowo-gardłowej w wykrywaniu wirusów układu oddechowego, w tym koronawirusów [109]. Potrzeba wiele pracy, aby włączyć diagnostykę opartą na próbkach śliny do codziennego użytku, określania stanu zdrowia i podejmowania ważnych decyzji klinicznych dotyczących opieki nad pacjentem. Metody pobierania próbek śliny oraz zawartości związków i potencjalnych biomarkerów w ślinie wymagają procesów standaryzacji, co stanowi aktualnie ograniczenie w jej powszechnym zastosowaniu [96,109].

## **5. METODY OZNACZANIA TFV I ENT W PRÓBKACH BIOLOGICZNYCH**

W toku przeprowadzanych eksperymentów poszukiwałam w literaturze metod oznaczania TFV oraz ENT. Istnieje wiele procedur oznaczania TFV w osoczu, kilka w moczu i jedna w ślinie. W przypadku ENT metody ograniczają się głównie do oznaczania w preparatach farmaceutycznych i osoczu. Wszystkie zaprezentowane poniżej metody zostały opracowane z wykorzystaniem techniki chromatografii cieczowej. W chwili rozpoczęcia przeze mnie eksperymentów przedstawionych w niniejszej pracy, w literaturze naukowej nie było opisanej żadnej metody analitycznej umożliwiającej jednoczesne, ilościowe oznaczanie TFV i Crn oraz ENT i Crn w moczu i osoczu człowieka.

### **5.1. Chromatograficzne metody oznaczania TFV w próbkach biologicznych**

Ogromne zainteresowanie wpływem terapii TFV na funkcjonowanie organizmu człowieka stanowi główną przyczynę poszukiwania metod analitycznych umożliwiających kontrolę jego zawartości w płynach ustrojowych. Pomimo faktu zwiększonego ryzyka zakażenia przy użyciu próbek krwi, publikowane doniesienia opisują głównie metody oznaczania TFV w osoczu/surowicy [28,33,110-124]. Niektóre z procedur analitycznych w protokole przygotowania próbki wykorzystują etap, jakim jest ekstrakcja do fazy stałej [112,115,117] lub derywatywacja [110,111,119]. Przeważająca część opracowanych metod analitycznych opiera się na spektrometrze mas (MS) jako detektorze [28,33,113-116,118,119,122-124]. Rzadziej stosowane są metody wymagające użycia powszechnie dostępnych detektorów UV [33,112,117] i spektrofluorymetrycznych (FLD) [110,111]. W tym podrozdziale omówiłam, opisane w literaturze, wybrane metody pozwalające na oznaczenie TFV w osoczu, moczu oraz ślinie. Ze względu na bardzo dużą liczbę publikacji związanych z oznaczaniem TFV w próbkach osocza, w tabeli 5 zaprezentowałam zestawienie wybranych parametrów chromatograficznych opracowanych metod pochodzących z artykułów wykorzystanych do napisania niniejszej rozprawy doktorskiej, uszeregowując informacje w kolejności pojawiania się publikacji.

#### ***Osocze***

Pierwsze dwie powstałe prace, w których autorzy korzystają z techniki chromatografii cieczowej do oznaczania TFV w próbkach osocza, pochodzą z 2003 roku. W obydwu przypadkach do oznaczania TFV badacze wykorzystali technikę HPLC

sprzężoną z detekcją FLD, a do separacji analitu kolumny chromatograficzne z wypełnieniem C8, różniące się między sobą długościami i średnicami. W obydwu przypadkach w skład fazy ruchomej wchodził acetonitryl (MeCN) jako organiczny rozpuszczalnik oraz chlorek bądź wodorosiarczan tetrabutylaminowy. W zestawionych pracach zauważalne różnice występują w prędkości przepływu fazy ruchomej, a wynikają z różnych wymiarów kolumny chromatograficznej. Ponadto, przy zastosowaniu tego samego odczynnika derywatyzującego – chloroacetaldehydu w badaniach zastosowano inne długości fal wzbudzenia i emisji oraz uzyskano granice oznaczalności (LOQ) różniące się czterokrotnie pomiędzy opisanymi metodami. W pierwszej opisaney pracy wartość LOQ wyniosła 20 ng ml<sup>-1</sup> [110], zaś w drugiej 5 ng ml<sup>-1</sup> [111].

Dwa lata później opublikowano kolejną pracę wykorzystującą technikę HPLC sprzężoną z detekcją UV do separacji TFV w osoczu. Autorzy po raz pierwszy zastosowali kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem C18, w skład fazy ruchomej wchodził metanol (MeOH) oraz bufor fosforanowy (PB), prędkość przepływu wynosiła 1 ml min<sup>-1</sup>, a LOQ 10 ng ml<sup>-1</sup> [112].

W późniejszym czasie zaprezentowano jeszcze dwie prace bazujące na detekcji UV. W obu przypadkach do analiz chromatograficznych wykorzystano kolumny C18, a jako składnik organiczny fazy ruchomej zastosowano MeOH. W porównywanych pracach czasy analiz różniły się znacząco. W pracy z roku 2007 wynosił 5 minut [33], w pracy z roku 2012 aż 30 minut [117], zaś w pracy z 2005 16 min [112]. Wartości LOQ w obydwu przypadkach były podobne i oscylowały w granicach od 8 ng ml<sup>-1</sup> [117] do 10 ng ml<sup>-1</sup> [33,112].

Wśród prac opublikowanych w latach 2006-2020 daje się wyraźnie zauważyć, iż najczęstszym stosowanym układem chromatograficznym do oznaczania TFV w próbkach osocza jest chromatografia cieczowa sprzężona z detekcją MS [28,33,113-116,118-124]. Kolumny wykorzystywane do analiz techniką LC-MS to głównie kolumny z wypełnieniem C8 i C18 o długościach od 50 do 150 mm. Fazy ruchome w przeważającej większości jako modyfikator organiczny zawierają MeCN bądź MeOH, Stosowane wodne frakcje faz ruchomych to głównie woda z dodatkiem kwasu mrówkowego o stężeniu od 0,05% do 1%, octanu amonu, mrówczanu amonu, rzadziej PB czy kwasu octowego. Czasy analiz są bardzo zróżnicowane i wahają się w granicach od 1,4 aż do 15 min. Obserwowane są również bardzo duże różnice w wartościach LOQ. Najniższa wartość jaką udało się osiągnąć autorom wynosiła 0,4 ng ml<sup>-1</sup>, zaś najwyższa,

aż 30,3 ng ml<sup>-1</sup>. W zdecydowanej większości prac spektrometrię mas wykonano w trybie jonizacji dodatniej, monitorując przejścia 288→176 [113,114,116,118,120-124].

Ciągle udoskonalanie stosowanych metod analitycznych wpływa na poprawę specyficzności, skrócenie czasu analiz, jak i na obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności. Dokładne zestawienie parametrów chromatograficznych przedstawionych metod zestawiono w tabeli poniżej.

**Tabela 5.** Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania TFV w próbkach osocza.

Rok	Technika	Zastosowana kolumna	Faza ruchoma/typ elucji	LOD	LOQ	Prędkość przepływu fazy ruchomej	Dodatkowe informacje	Ref.
2003	HPLC-FLD	Chromspher C8 (150×4,6 mm, 5 μm)	10 mmol l <sup>-1</sup> fosforan sodu i 5 mmol l <sup>-1</sup> wodorosiarczan tetrabutylamoniowy (pH 7)/MeCN // elucja gradientowa	-	20 ng ml <sup>-1</sup>	1,5 ml min <sup>-1</sup>	λ <sub>ex</sub> 254 nm, λ <sub>em</sub> 425 nm Czas analizy: 20 min	[110]
2003	HPLC-FLD	Cluzeau C8 (250×3 mm, 5 μm)	5 mmol l <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> chlorek tetrabutylamoniowy (TBA) 5 mmol l <sup>-1</sup> (pH 6)/ MeCN // elucja izokratyczna	-	5 ng ml <sup>-1</sup>	0,5 ml min <sup>-1</sup>	λ <sub>ex</sub> 236 nm, λ <sub>em</sub> 420 nm Czas analizy: brak danych	[111]
2005	HPLC-UV	Atlantis™ dC-18 (150×3,9 mm, 5,0 μm)	20 mmol l <sup>-1</sup> PB (pH 5,7)/MeOH // elucja gradientowa	-	10 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	λ 259 nm Czas analizy: 16 min	[112]
2006	LC-MS/MS	Synergi RP HPLC (150×2,0 mm, 4 μm)	1% kwas octowy/3% MeCN // elucja izokratyczna	-	10 ng ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. kapilary: 300 °C Napięcie kapilary: 3200 V Gaz kolizyjny: argon Czas analizy: 7 min	[113]
2007	HPLC-DAD HPLC-MS	Atlantis dC-18 (150×3,0 mm, 3 μm)	5 mmol l <sup>-1</sup> octan amonu (pH 2,5)/MeOH // elucja izokratyczna	3 ng ml <sup>-1</sup> 2 ng ml <sup>-1</sup>	10 ng ml <sup>-1</sup> 5 ng ml <sup>-1</sup>	0,6 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: λ 260 nm Detekcja MS: Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Napięcie kapilary: 4000 V Gaz rozpylający: azot Czas analizy: 5 min	[33]
2008	LC-MS/MS	Chromolith Speed Rod RP18 (50×4,6 mm)	40 mmol l <sup>-1</sup> octan amonu (pH 3,0)/MeCN // elucja izokratyczna		10 ng ml <sup>-1</sup>	0,7 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Napięcie kapilary: 5500 V Gaz kolizyjny: azot Czas analizy: 2 min	[114]
2008	LC-MS	Atlantis dC-18 (150×4,6 mm, 3 μm)	woda + 0,05% kwas mrówkowy/MeCN + 0,05% kwas mrówkowy // elucja gradientowa	2,0 ng ml <sup>-1</sup>	15,6 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288 Napięcie kapilary: 3500 V Gaz rozpylający: azot Czas analizy: 15 min	[115]
2009	LC-MS/MS	Synergi RP HPLC (150×2,0 mm, 4 μm)	1% kwas octowy/3% MeCN // elucja izokratyczna	-	10 ng ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. kapilary: 300 °C Napięcie kapilary: 3200 V Gaz rozpylający: azot Gaz kolizyjny: argon Czas analizy: 11 min	[116]
2012	HPLC-UV	Phecda C18 (250×4,6 mm, 5 μm)	PB z 0,08% trietanolaminy (pH 3,52)/MeOH // elucja gradientowa	-	8 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	λ 270 nm Czas analizy: 30 min	[117]
2013	LC-MS/MS	Prontosil C18AQ, (100×4,6 mm, 3 μm)	1 mmol l <sup>-1</sup> octan amonu (pH 6,5)/MeCN // elucja izokratyczna	-	2 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja ujemna, m/z 286→134 Napięcie kapilary: -4500 V Gaz kolizyjny: azot Czas analizy: 3 min	[28]

**Tabela 5.** Ciąg dalszy.



Rok	Technika	Zastosowana kolumna	Faza ruchoma//typ elucji	LOD	LOQ	Prędkość przepływu fazy ruchomej	Dodatkowe informacje	Ref.
2013	UPLC-MS/MS	Waters Acquity HSS T3 (50×2,1 mm, 1,8 μm)	woda + kwas mrówkowy 0,1%/ MeCN + kwas mrówkowy 0,1% // elucja gradientowa	2 ng ml <sup>-1</sup>	6 ng ml <sup>-1</sup>	0,6 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. rozpylania: 450 °C Napięcie kapilary: 1000 V Gaz rozpylający: azot Gaz kolizyjny: argon Czas analizy: 3 min	[118]
2015	LC-MS/MS	Zorbax SCX (50×3,0 mm, 5 μm)	15 mmol l <sup>-1</sup> mrówczan amonu (pH 2,5)/MeCN // elucja izokratyczna	-	5 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 316→176 Napięcie rozpylania jonowego: 5500 V Czas analizy: 1,5 min	[119]
2015	UPLC-MS/MS	Acquity UPLC HSS T3 (150×2,1 mm, 1,8 μm)	woda + kwas mrówkowy 0,05%/ MeCN+ kwas mrówkowy 0,05% // elucja gradientowa	7,8 ng ml <sup>-1</sup>	15,6 ng ml <sup>-1</sup>	0,4 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. rozpylania: 400°C Napięcie kapilary: 1000 V Gaz rozpylający: azot Czas analizy: 3,7 min	[120]
2016	HPLC-MS/MS	Synergi fusion-RP (150×4,6 mm, 4 μm)	1% kwas mrówkowy/MeOH // elucja gradientowa	-	4 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. rozpylania: 500 °C Napięcie rozpylania jonowego: 5500 V Czas analizy: 6 min	[121]
2017	LC-MS/MS	ACE C18 (50×3,0 mm, 3 μm)	woda/tetrahydrofuran // elucja gradientowa	15,1 ng ml <sup>-1</sup>	30,3 ng ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. kapilary 300 °C Gaz rozpylający: azot i hel Czas analizy: 9 min	[122]
2019	UHPLC-MS/MS	Waters Acquity UHPLC HSS T3 (100×2,1 mm, 1,8 μm)	woda + 20 mmol l <sup>-1</sup> octanu amonu (pH 6,89) + 0,1% kwas mrówkowy/MeOH + 20 mmol l <sup>-1</sup> octanu amonu (pH 6,89) + 0,1% kwas mrówkowy // elucja gradientowa	-	0,4 ng ml <sup>-1</sup>	Gradient prędkości przepływu: 0,4 ml min <sup>-1</sup> /0-4,6 min 0,45 ml min <sup>-1</sup> /4,7-8 min 0,4 ml min <sup>-1</sup> / 8,1-10 min	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. rozpylania: 300 °C Czas analizy: 10 min	[123]
2020	LC-MS/MS	Acquity UPLC HSS PFP (50×2,1 mm, 1,8 μm)	10 mmol l <sup>-1</sup> mrówczan amonu w wodzie (pH 2,5)/MeOH // elucja gradientowa	-	0,3 ng ml <sup>-1</sup>	0,5 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 288→176 Temp. źródła: 600 °C Napięcie rozpylania jonów: 5500 V Gaz kolizyjny i osłonowy: azot Czas analizy: 1,4 min	[124]

## ***Mocz i ślina***

Pierwszą publikacją, w której można znaleźć informacje dotyczące użycia próbek moczu do oznaczania TFV oraz wykorzystania techniki HPLC jest praca opisana w 2015 przez M. Simiele i współpracowników [125], powstanie dwóch kolejnych prac datuje się na rok 2017. W celu separacji i identyfikacji TFV autorzy zastosowali kolumny chromatograficzne C18, a także kolumnę z wypełnieniem pentafluorofenylowym (PFP) o długościach od 100 do 150 mm. Jako organiczny składnik fazy ruchomej wykorzystywali MeCN, a wodną frakcję stanowił kwas mrówkowy bądź PB. W jednej z prac autorzy nie umieścili szczegółowych informacji na temat zastosowanych warunków separacji, przedstawili jedynie wartość LOD, która wynosiła 5 ng ml<sup>-1</sup> [127]. W pracy z roku 2015 autorzy zastosowali detekcję MS w trybie jonizacji dodatkowo monitorując pojedynczy jon o stosunku masy do ładunku (*m/z*) równym 288,18. Granice wykrywalności i oznaczalności wynosiły odpowiednio 195 ng ml<sup>-1</sup> i 391 ng ml<sup>-1</sup> [125]. W pracach z roku 2017 autorzy zastosowali detektor DAD prowadząc badania przy długości fali 260 nm [126], bądź detekcję MS monitorując TFV przy przejściach *m/z* 288,3→176,3 i 288,3→159,2 w jonizacji dodatkowo [127]. W metodzie HPLC-DAD LOD i LOQ wynosiły odpowiednio 140 i 420 ng ml<sup>-1</sup> [126] i były porównywalne z wartościami osiągniętymi dla metody HPLC-MS z 2015 r. [125].

Na temat śliny jako materiału wykorzystywanego do oznaczania TFV opublikowano jedną pracę w roku 2015. Autorem tej pracy jest E. Yamada wraz ze współpracownikami [128]. W publikacji przedstawiono procedurę oznaczania kilku leków przeciwwirusowych, w tym TFV, w próbkach śliny i osocza z zastosowaniem techniki LC-MS/MS. Autorzy przeprowadzali separację i identyfikację stosując kolumnę C18. Rozdzielenie składników próbki przeprowadzili z wykorzystaniem fazy ruchomej składającej się z kwasu mrówkowego i MeCN. Spektrometrię mas wykonali w trybie jonizacji dodatkowo, przy monitorowaniu przejść prekursor→produkt 288→176. Granica oznaczalności metody wyniosła 1 ng ml<sup>-1</sup>.

Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji opisanych powyżej metod dedykowanych oznaczania TFV w próbkach moczu i śliny przedstawiono w tabeli poniżej.

**Tabela 6.** Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania TFV w próbkach moczu i śliny.

Rok	Technika	Matryca	Zastosowana kolumna	Faza ruchoma/typ elucji	LOD	LOQ	Prędkość przepływu fazy ruchomej	Dodatkowe informacje	Ref.
2015	HPLC-MS	Mocz	Atlantis T3 (150×4,6 mm, 5 μm)	woda + 0,05% kwas mrówkowy/ MeCN + 0,05% kwas mrówkowy // elucja gradientowa	195 ng ml <sup>-1</sup>	391 ng ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, <i>m/z</i> 288,18 Temp. źródła: 110 °C Napięcie kapilary: 3550 V Gaz nośny: azot Czas analizy: 11,5 min	[125]
2015	LC-MS/MS	Ślina	C18 (50×1,5 mm, 5 μm)	5 mmol l <sup>-1</sup> kwas mrówkowy/ MeCN // elucja izokratyczna	-	1 ng ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, <i>m/z</i> 288→176 Temp. gazu: 250 °C Napięcie kapilary: 6000 V Gaz nebulizujący i rozpylający: argon Czas analizy: 6 min	[128]
2017	HPLC-UV	Mocz	Kinetex C18 (150×4,6 mm, 5 μm)	0,1% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,0/ MeCN // elucja gradientowa	140 ng ml <sup>-1</sup>	420 ng ml <sup>-1</sup>	1 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: λ 260 nm Czas analizy: 7 min	[126]
2017	LC-MS/MS	Mocz	Kinetex PFP (100×4,6 mm, 2,6 μm)	-	5 ng ml <sup>-1</sup>	-	-	Jonizacja dodatnia, <i>m/z</i> 288,3→176,3 i 288,3→159,2 Czas analizy: 5 min	[127]

## 5.2. Chromatograficzne metody oznaczania ENT w próbkach biologicznych

W przypadku ENT, metodologie prezentowane w literaturze koncentrują się głównie na problemie oceny jego zawartości w preparatach farmaceutycznych [130,134,138,139-141], osoczu [129,131,132,135,137,140] i jego filtracji [135]. Istnieją również dwie publikacje opisujące procedury oznaczania ENT w moczu szczura [133] oraz jednojądrzastych komórkach krwi obwodowej [136].

Jedną z pierwszych publikacji związanych z oznaczaniem ENT w próbkach osocza powstała w roku 2009. Autorzy przedstawili metodę opartą na technice LC-MS/MS, którą opracowali i poddali procesowi walidacji do celów oznaczania ENT w osoczu człowieka. Próbkę osocza przed analizą poddane były ekstrakcji do fazy stałej w układzie odwróconych faz. Dolna granica oznaczalności metody wyniosła  $5 \text{ pg ml}^{-1}$ . Autorzy pracy rozdzielenie chromatograficzne przeprowadzili przy użyciu kolumny C18, a faza ruchoma składała się z mieszaniny wodorowęglanu amonu z dodatkiem wodorotlenku amonu oraz MeOH. Detekcja ENT w próbkach osocza zachodziła w warunkach jonizacji w trybie dodatnim, monitorowano przejścia  $278 \rightarrow 152$  [129]. Kolejne prace dotyczące oznaczania ENT w osoczu powstały w latach 2011, 2012, 2014, 2016 oraz 2017 i opierały się na technice chromatografii cieczowej połączonej z detekcją MS [131,132,135,137] lub UV [141]. W przypadku zastosowania detektora MS ENT był oznaczany w jonizacji dodatniej, a monitorowane były przejścia  $278,1 \rightarrow 152,1$  [131, 132],  $277,9 \rightarrow 152,2$  i  $277,9 \rightarrow 135,2$  [135] oraz  $278,04 \rightarrow 152,01$  [137]. Podczas, gdy analizy prowadzono z wykorzystaniem detektora UV, analityczna długość fali ustawiona była na 218 nm [140]. Na etapie przygotowania próbki stosowana była ekstrakcja do fazy stałej z wykorzystaniem sorbetów w odwróconym układzie faz [131] lub sorbentów kationowymiennych [135, 137], jak również ekstrakcja ciecz-ciecz wspomagana wysalaniem [132]. Składniki próbek osocza separowane były na kolumnach C-18 [131, 132, 140] bądź HILIC [135, 137]. Uzyskane granice oznaczalności dla metod z detekcją MS wahały się od  $50 \text{ pg ml}^{-1}$  [131, 132] do  $1000 \text{ pg ml}^{-1}$  [135], podczas gdy w metodzie z detekcją UV, jak można było się spodziewać granica oznaczalności była wyższa i wynosiła  $0,039 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  [140].

W przypadku oznaczania ENT w filtracji osocza [135] protokół obejmował wykorzystanie mikroekstrakcję do upakowanego sorbentu. Rozdzielenie chromatograficzne prowadzono w kolumnie Acquity BEH AMIDE przy użyciu fazy ruchomej składającej się z MeCN i octanu amonu. W celu identyfikacji ENT spektrometr

mas ustawiono w tryb jonizacji dodatniej, monitorowano przejścia 277,9→152,2 i 277,9→135,2. Opracowana metoda została poddana procesowi walidacji. Wyznaczono wartości LOD i LOQ, które wynosiły odpowiednio 150 pg ml<sup>-1</sup> i 500 pg ml<sup>-1</sup>.

Technikę ultra-wysokosprawnej chromatografii cieczowej oddziaływań hydrofilowych sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (HILIC–UHPLC-MS/MS) wykorzystano do oznaczania ENT w próbkach moczu szczura [133]. Metodę HILIC autorzy porównali z opracowaną również przez nich metodą w odwróconym układzie faz RP-UHPLC-MS/MS, a wyniki które uzyskali wykazały nieco wyższą czułość i wysoką dokładność w całym zakresie liniowości dla metody HILIC. Stosując chromatografię oddziaływań hydrofilowych ENT rozdzielano w kolumnie analitycznej Acquity BEH Amide wykorzystując fazę ruchomą składającą się z MeCN oraz octanu amonu. Granica oznaczalności wyznaczona na próbkach moczu szczura wynosiła 100 pg ml<sup>-1</sup>. W przypadku układu faz odwróconych, ENT był separowany z wykorzystaniem kolumny Acquity BEH C18, a faza ruchoma składała się z MeCN i kwasu mrówkowego. Wartości LOD i LOQ dla powyższej metody nie zostały przedstawione w publikacji. Warunki detekcji zostały precyzyjnie dopasowane zarówno w trybie separacji HILIC jak i RP. Źródło jonów ustawiono w trybie jonizacji dodatniej. Analizy ENT monitorowano przy przejściach 277,9 → 152,2 i 277,9 → 135,2.

W literaturze opisano również metodologię oznaczania ENT w komórkach krwi [136] wykorzystującą technikę UHPLC-MS/MS. Separacja chromatograficzna została przeprowadzona za pomocą kolumny Acquity UHPLC HSS T3. W celu ilościowego oznaczenia monitorowano przejście 278,1 → 152,1. Elucję przeprowadzono z gradientem fazy ruchomej złożonej z H<sub>2</sub>O i MeCN, obie zawierające 0,05% kwas mrówkowy. Autorzy wyznaczyli wartości granic wykrywalności i oznaczalności które wynosiły odpowiednio 0,0195 ng i 0,039 ng.

Poza próbkami biologicznymi ENT oznaczany jest również w preparatach farmaceutycznych. W metodach tych jako detektory stosuje się spektrofotometrię w przeciwieństwie do metod obejmujących próbki biologiczne, w których wykorzystuje się detektory MS. W 2010 r. Sérgio Luiz Dalmora wraz ze współpracownikami opracowali i zwalidowali chromatograficzną metodę oznaczania ENT w preparacie medycznym występującym w postaci tabletek. Jako fazę stacjonarną zastosowali kolumnę C18. Faza ruchoma składała się z MeCN oraz buforu fosforanowego (PB). Autorzy wykorzystali detektor UV wyposażony w matrycę diodową, a wykrywanie prowadzono przy 253 nm. LOD i LOQ wyniosły 0,39 i 0,5 µg ml<sup>-1</sup> [130].

Kolejna praca związane z tematyką oznaczania ENT w preparatach farmaceutycznych powstały w roku 2014 [134]. Do wykrywania i identyfikacji ENT autorzy wykorzystali technikę RP-HPLC z detekcją UV i analityczną długością fali 254 nm. Separację przeprowadzili w kolumnie Agilent ODS UG C18, wykorzystując MeOH i wodę jako składniki fazy ruchomej. Granice wykrywalności i oznaczalności wyniosły odpowiednio 0,372 i 1,128 mg ml<sup>-1</sup>.

W latach 2017-2019 opublikowano 4 prace dotyczące oznaczania ENT w preparatach farmaceutycznych. Wśród tych metodologii do oznaczania ENT autorzy wykorzystują układ chromatograficzny sprzężony z detekcją UV. Kolumny wykorzystywane do analiz techniką HPLC-UV to głównie kolumny z wypełnieniem C18 o długościach od 150 do 250 mm. Jako organiczny składnik faz ruchomych autorzy wykorzystują MeCN bądź MeOH, Czasy analiz dla każdej z metod są zbliżone i wynoszą od 10 do 11 minut. Tylko w przypadku dwóch prac autorzy opublikowali wartości LOD i LOQ otrzymane dla detekcji przy dwóch różnych długościach fal: 218 nm [140] i 254 nm [141]. W trzech pracach detekcję prowadzono przy zbliżonych długościach fal 254-255 nm [138, 139, 141].

Wybrane warunki chromatograficzne oraz parametry walidacji opisanych powyżej metod dedykowanych oznaczaniu ENT w próbkach biologicznych i preparatach farmaceutycznych zostały zestawione w tabeli 7.

**Tabela 7.** Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania ENT w próbkach biologicznych i preparatach farmaceutycznych.

Rok	Technika	Matryca	Zastosowana kolumna	Faza ruchoma // typ elucji	LOD	LOQ	Prędkość przepływu fazy ruchomej	Dodatkowe informacje	Ref.
2009	LC-MS/MS	Osocze	Xterra MS C18, (50×2,1 mm, 5 μm)	wodorowęglanu amonu 5 mmol l <sup>-1</sup> + 0,15% wodorotlenku amonu (pH 10)/ MeOH // elucja gradientowa	-	5 pg ml <sup>-1</sup>	0,3 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 278→152 Temp. kapilary: 425°C Napięcie rozpylania: 1600 V Czas analizy: 4 min	[129]
2010	HPLC-UV	Tabletka	Gemini C18 (150x4,6 mm, 5 μm)	PB 0,01 mol l <sup>-1</sup> , pH 4/ MeCN // elucja gradientowa	0,39 μg ml <sup>-1</sup>	0,5 μg ml <sup>-1</sup>	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: λ 253 nm Czas analizy: -	[130]
2011	LC-ESI-MS/MS	Osocze	XBridge-C18 (50×4,6 mm, 5 μm)	wodorowęglan amonu 10 mmol l <sup>-1</sup> pH 10,5/ MeOH // elucja izokratyczna	0,1 pg	50 pg ml <sup>-1</sup>	0,3 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 278,1→152,1 Temp. źródła: 500°C Napięcie: 5500 V Czas analizy: 5 min	[131]
2012	LC-MS	Osocze	Lichrospher RP C18 HPLC (150x2,0 mm; 5 μm)	0,1% kwasu octowego - 0,2 mmol l <sup>-1</sup> octanu amonu w wodzie / MeCN // elucja gradientowa	-	50 pg ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 278,1→152,1 Temp. bloku: 220°C Temp. gazu suszącego: 280°C Napięcie kapilarnie: 1500 V Czas analizy: 10 min	[132]
2012	HILIC-UHPLC-MS/MS	Mocz szczura	Acquity BEH Amide (100×2,1 mm, 1,7 μm)	5 mmol l <sup>-1</sup> octan amonu pH 4,0/ MeCN // elucja izokratyczna	-	100 pg ml <sup>-1</sup>	0,3 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 277,9→152,2, 277,9→135,2 Temp. źródła: 130°C Napięcie kapilarnie: 3500 V Gaz rozpylający: azot Temp. gazu: 450°C Czas analizy: 2 min	[133]
	RP-UHPLC-MS/MS		Acquity BEH C18 (100x2,1 mm, 1,7 μm)	0,01% kwas mrówkowy/ MeCN // elucja izokratyczna	-	-	0,3 ml min <sup>-1</sup>	Warunki jak powyżej z wyjątkiem napięcia kapilarnego: 500 V	
2014	HPLC-UV	Tabletka	Agilent ODS UG C18 (250x4,6 mm)	H <sub>2</sub> O/MeOH //-	0,372 mg ml <sup>-1</sup>	1,128 mg ml <sup>-1</sup>	0,8 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: λ 254 nm Czas analizy: 10 min	[134]
2014	UHPL-MS/MS	Osocze	Acquity BEH AMIDE (100×2,1mm, 1,7μm)	5 mmol l <sup>-1</sup> octan amonu pH 4,0/ MeCN // elucja izokratyczna	300 pg ml <sup>-1</sup>	1000 pg ml <sup>-1</sup>	0,3 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, m/z 277,9→152,2, 277,9→135,2 Temp. źródła: 130°C Napięcie kapilarnie: 3500 V Gaz rozpylający: azot Temp. gazu: 450°C	[135]
		Filtrat osocza			150 pg ml <sup>-1</sup>	500 pg ml <sup>-1</sup>			

**Tabela 7. Ciąg dalszy**

Rok	Technika	Matryca	Zastosowana kolumna	Faza ruchoma // typ elucji	LOD	LOQ	Prędkość przepływu fazy ruchomej	Dodatkowe informacje	Ref.
2016	UHPL-MS/MS	Komórki krwi	Acquity UHPLC HSS T3 1,8 $\mu\text{m}$ (2,1 $\times$ 150 mm)	woda + 0,05% kwas mrówkowy/ MeCN + 0,05% kwas mrówkowy // elucja gradientowa	0,0195 ng	0,039 ng	0,4 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, $m/z$ 278,1 $\rightarrow$ 152,1, 278,1 $\rightarrow$ 81,1 Temp. źródła: 150°C Napięcie kapilarne: 1000 V Temp. desolwatacji: 400°C Czas analizy: 6 min	[136]
2016	UPLC-MS/MS	Osocze szczura	ACQUITY UPLC BEH HILIC (100 $\times$ 2,1 mm, 1,7 $\mu\text{m}$ )	woda + 0,2% kwas mrówkowy/ MeOH // elucja izokratyczna	-	0,5 ng ml <sup>-1</sup>	0,2 ml min <sup>-1</sup>	Jonizacja dodatnia, $m/z$ 278,04 $\rightarrow$ 152,01 Temp. źródła: 120°C Temp. desolwatacji: 350°C Napięcie kapilarne: 3800 V	[137]
2017	HPLC-UV	Tabletka	Phenomenox C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	woda + kwas octowy pH 3/ MeCN // elucja izokratyczna	-	-	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: $\lambda$ 254 nm Czas analizy: 11 min	[138]
2017	HPLC-UV	Tabletka	C18 (250 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	MeOH/MeCN + trietyloamina // elucja izokratyczna	-	-	1,2 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: $\lambda$ 255 nm Czas analizy: 10 min	[139]
2017	HPLC-UV	Tabletka Osocze	ODS Hypersil (150 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	10 mmol l <sup>-1</sup> PB pH 3,5/ MeCN // (prawdopodobnie izokratyczna)	0,0097 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0,039 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: $\lambda$ 218 nm	[140]
2019	HPLC-UV	Tabletka	C18 (250 $\times$ 4,5 mm)	H <sub>2</sub> O/ MeOH // prawdopodobnie gradient	0,357 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1,125 $\mu\text{g ml}^{-1}$	1,0 ml min <sup>-1</sup>	Detekcja UV: $\lambda$ 254 nm Czas analizy: 10 min	[141]



## CEL PRACY

Szybka diagnostyka medyczna jest obecnie bardzo rozwijającą się gałęzią medycyny i diagnostyki laboratoryjnej. Na jej dynamiczny rozwój ma wpływ postęp wiedzy medycznej i techniki. Szybkie testy chromatograficzne stanowią przydatne narzędzie diagnostyczne w każdej praktyce klinicznej. Ich zaletą jest szybkość, precyzja, dokładność oraz prostota wykonania. W wielu przypadkach wykonanie takich testów ułatwia postawienie trafnej diagnozy i wdrożenie odpowiedniego, celowanego leczenia. W przypadku leczenia chorych z aktywnymi wirusami HIV/HBV niezbędna jest kontrola dawki przyjmowanego leku jak i jej wpływu na funkcjonowanie nerek. Proponowane metody separacyjne oparte na technice HPLC mogą w przyszłości stanowić użyteczne narzędzia analityczne wykorzystywane do ilościowego oznaczania wybranych leków przeciwwirusowych w diagnostyce laboratoryjnej.

Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie i walidacja nowoczesnych metod analitycznych z wykorzystaniem techniki HPLC z detekcją spektrofotometryczną (HPLC-UV) do oznaczania TFV, ENT oraz Crn w wybranych matrycach biologicznych. Eksperymenty przeprowadzono z wykorzystaniem techniki HPLC sprzężonej z detekcją spektrofotometryczną oraz spektrofluorymetryczną. Badania materiału, który jest skomplikowany pod względem składu, tak jak próbki biologiczne, bardzo często wymuszają opracowanie odpowiednich procedur ułatwiających ich późniejszą analizę. Z uwagi na fakt, iż etap przygotowania próbki do analizy generuje najwięcej błędów, prowadzony przeze mnie proces optymalizacji był determinowany potrzebą minimalizacji liczby etapów przygotowania próbki do końcowej analizy.

Złożoność zadań badawczych wymagała sprecyzowania szczegółowych celów, które obejmowały:

- a) opracowanie nowych metod chromatograficznych umożliwiających jednoczesne oznaczanie Crn oraz wybranych leków przeciwwirusowych w próbkach osocza i moczu człowieka,
- b) opracowanie precyzyjnych i dokładnych metod analitycznych do oznaczania TFV i ENT w próbkach śliny człowieka,
- c) zminimalizowanie zużycia toksycznych rozpuszczalników organicznych wykorzystywanych w procesie analitycznym,
- d) optymalizację warunków przygotowania próbek do końcowej analizy,
- e) walidację opracowanych metod analitycznych,

- f) określenie farmakokinytyki wydalania TFV z moczem przy jednoczesnej normalizacji na Crn,
- g) oznaczenie zawartości TFV w ślinie pacjenta.

## **CZEŚĆ EKSPERYMENTALNA**

## 6. ODCZYNNIKI, APARATURA, MATERIAŁ DO BADAŃ

W niniejszym rozdziale przedstawiono odczynniki oraz aparaturę pomiarową wykorzystaną podczas pracy eksperymentalnej.

### Odczynniki

- ✚ S. Witko, Łódź, Polska - acetonitryl (MeCN) o stopniu czystości HPLC, min. 99,9%,
- ✚ J.T. Baker, Deventer, Holandia - metanol (MeOH) o stopniu czystości HPLC, kwas chlorowodorowy 35-38% cz.d.a., wodorofosforan(V) disodu siedmiowodny ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ) cz.d.a., diwodorofosforan(V) sodu jednowodny ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) cz.d.a.,
- ✚ Sigma-Aldrich, St. Louis, USA - kreatynina (Crm)  $\geq 98\%$ , entekawir (ENT), tenofovir (TFV),
- ✚ Merck, Darmstadt, Niemcy - kwas chlorowy(VII) (PCA) 70% cz.d.a.,
- ✚ Chempur, Piekary Śląskie, Polska - wodorotlenek sodu (NaOH) cz.d.a., kwas octowy ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) cz.d.a., kwas chlorowodorowy (HCl) cz.d.a.,
- ✚ POCH S.A., Gliwice, Polska - kwas trichlorooctowy (TCA) cz.d.a.,

### Roztwory

- ✚ Roztwory wodorofosforanu(V) disodu o stężeniach: 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04 i 0,05  $\text{mol l}^{-1}$
- ✚ Roztwory diwodorofosforanu(V) sodu o stężeniach: 0,005, 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04 i 0,05  $\text{mol l}^{-1}$
- ✚ Bufor fosforanowy o określonych wartościach pH przygotowano miareczkując potencjometrycznie wobec elektrody szklanej roztwór  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  roztworem  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  o tym samym stężeniu.
- ✚ Roztwór kwasu chlorowego(VII) o stężeniu 3  $\text{mol l}^{-1}$ .
- ✚ Roztwory kwasu solnego o stężeniach 0,001%, 0,0025%, 0,005%, 0,1%, 0,2%, 0,3%.
- ✚ Roztwory TCA o stężeniach 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%.
- ✚ Roztwory kwasu octowego o stężeniach 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 8%, 10%.
- ✚ Roztwór standardu TFV o stężeniu 1  $\text{mg ml}^{-1}$  (pozostałe roztwory o różnych stężeniach przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego).
- ✚ Roztwór standardu ENT o stężeniu 1  $\text{mg ml}^{-1}$  (pozostałe roztwory o różnych stężeniach przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego).

- ✚ Roztwór standardu Crn o stężeniu  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  (pozostałe roztwory o różnych stężeniach przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu wyjściowego).

## **Aparatura**

### *Chromatografy:*

W badaniach wykorzystane zostały dwa chromatografy cieczowe, sterowane za pomocą komputera z odpowiednim oprogramowaniem HP ChemStation for LC 3D lub OpenLAB CDS, ChemStation Edition.

- ✚ Chromatograf cieczowy firmy Agilent 1200 zbudowany z następujących elementów: pompy podwójnej, automatycznego podajnika próbek, modułu odgazowującego, termostatu, kolumny chromatograficznej oraz detektora UV-Vis z matrycą diodową,
- ✚ Chromatograf cieczowy firmy Hewlett-Packard 1100 zbudowany z: pompy poczwórnej, automatycznego podajnika próbek, modułu odgazowującego, termostatu oraz detektora fluorescencyjnego firmy Agilent model 1200.

### *Kolumny chromatograficzne:*

- ✚ ZORBAX SB C-18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) firmy Agilent Technologies,
- ✚ Lichrosorb RP-18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $10 \mu\text{m}$ ) firmy Alltech,
- ✚ PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) firmy Phenomenex.
- ✚ Aeris WIDEPOR XB-C18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) firmy Phenomenex,
- ✚ Kinetex HILIC ( $100 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $2,6 \mu\text{m}$ ) firmy Phenomenex,
- ✚ Poroshell ( $75 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $2,7 \mu\text{m}$ ) firmy Agilent Technologies,

*Dejonizator wody:* Millipore (Milli-Q-RG)

### *pH metry:*

- ✚ Hanna Instruments HI 221,
- ✚ Mettler Toledo FiveEasy PLUS FP20,

### *Wagi laboratoryjne:*

- ✚ Scaltec, model SBC 21,
- ✚ OHAUS, model Pioneer PA214CM

*Wytrząsarka:* Vortexmaster – Sunlab SU1901

*Wirówka laboratoryjna:* Hettich Mikro 200R z funkcją chłodzenia,

*Zamrażarka niskotemperaturowa:* Panasonic Healthcare Co.Ltd., model MDF-U55V-PE

*Termostat:* Grant QB

*Pipety automatyczne:* Zestaw pipet Discovery comfort HTL

## **Material do badań**

Badania prowadzono na próbkach biologicznych takich jak mocz osocze i ślina. Przed przystąpieniem do badań otrzymano zgodę Komisji ds. bioetyki badań naukowych Uniwersytetu Łódzkiego 12/KBBN-UŁ/I/2015, 22/KBBN-UŁ/II/2015.

### *Mocz*

Próbki moczu pobierano zarówno od osób zdrowych, jak i od pacjentów z WZWB leczonych TFV w postaci tabletek powlekanych Viread w dawkach 123 lub 245 mg. Pierwsze poranne próbki moczu od zdrowych ochotników w różnym wieku i płci pobrano anonimowo. Zdrowym dawcom nie podawano żadnych leków przed pobraniem próbek moczu. Próbki moczu były dostarczane bezpośrednio do laboratorium i analizowane bezzwłocznie lub zamrożone i przechowywane w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy.

### *Osocze*

Optymalizacja warunków analitycznych była przeprowadzono na próbkach osocza pobranych od zdrowych ochotników. Krew pobierano przez nakłucie żyły na czczo do probówki zawierającej EDTA, następnie schładzano na lodzie i wirowano przy 800 g przez 15 min w temperaturze pokojowej w ciągu 30 min od pobrania. Zebrane osocze (supernatant) próbki przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### *Ślina*

Próbki śliny pozyskano na czczo od zdrowych osób w różnym wieku i płci, które pobierały próbkę samodzielnie zgodnie ze standardową procedurą poprzez bezpośrednie wprowadzenie materiału do probówki polipropylenowej, po uprzednim przepłukaniu jamy ustnej wodą. Następnie próbki śliny po ich dostarczeniu do laboratorium poddano procedurze analitycznej lub zamrożono i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu analizy.

## **WYNIKI**

## **7. OPACOWANIE PROCEDURY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA TFV I CRN W MOCZU**

RP-HPLC jest jedną z najpopularniejszych technik analitycznych dedykowanych do analizy próbek biologicznych. Z uwagi na fakt, iż w literaturze brak jest informacji dotyczących metod analitycznych służących do jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w moczu pożądanym jest, aby udoskonalać i rozwijać nowe narzędzia umożliwiające szybkie, proste, dokładne i selektywne protokoły rutynowych analiz wybranych związków w płynach ustrojowych. Metody takie mogą być wykorzystywane w analizach klinicznych, a ich wyniki mogą przyczynić się do optymalizacji procedur leczenia pacjentów zakażonych wirusami HIV i HBV.

Stosowana terapia przeciwwirusowa opiera się na wielu wytycznych, w tym monitorowaniu poziomu leków w płynach ustrojowych pacjenta. Niestety, przeprowadzone badania wykazują dużą indywidualną zmienność TFV w płynach ustrojowych pomimo tej samej dawki leku przyjmowanej przez różnych pacjentów [118]. Różnica ta wynika z jakości i szybkości metabolizmu danej jednostki oraz występujących interakcji między lekami. Konieczne jest zatem monitorowanie czynności układu wydalniczego u pacjentów poddanych terapii TFV, gdyż jego toksyczne działanie ukierunkowane jest na nerki, co związane jest z usuwaniem leku przez kanaliki nerkowe. Przeprowadzając badanie klirensu Crn możliwe jest określenie skuteczności filtracji nerkowej [125]. W związku z powyższym u pacjentów z zaburzeniami czynności nerek konieczne jest dostosowanie indywidualnie dobranej dawki leku [120].

Poniżej opisano procedurę rozwijania nowej metody chromatograficznej dedykowanej do jednoczesnego oznaczania Crn i TFV w próbkach moczu, które w części zostały opublikowane w pracy *Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples* [142]. W badaniach wykorzystano technikę HPLC sprzężoną z detektorem UV. Opracowaną procedurę zastosowano do oznaczania TFV w próbkach moczu.

### **7.1. Dobór warunków rozdzielania TFV i Crn w moczu**

Ogromnym wyzwaniem podczas procesu rozwijania nowych metod analitycznych jest dobranie odpowiednich parametrów chromatograficznych, które uwzględniają właściwości fizykochemiczne oznaczanych substancji, zapewniając uzyskanie satysfakcjonujących wyników separacji. Analiza chromatograficzna jako końcowy etap całego procesu analitycznego powinna zapewnić prawidłowe rozdzielanie badanych



związków od pozostałych składników matrycy biologicznej. Wynik separacji, którym jest chromatogram, pozwala uzyskać wiarygodne informacje na temat składu i zawartości związków monitorowanych w próbce.

W pierwszym etapie prowadzonych badań, ustalono optymalne warunki pracy układu chromatograficznego, tj. dokonano wyboru odpowiedniej kolumny chromatograficznej, dobrano analityczne długości fali detekcji oraz skład fazy ruchomej umożliwiający jak najlepsze rozdzielanie i wykrywanie wybranych analitów.

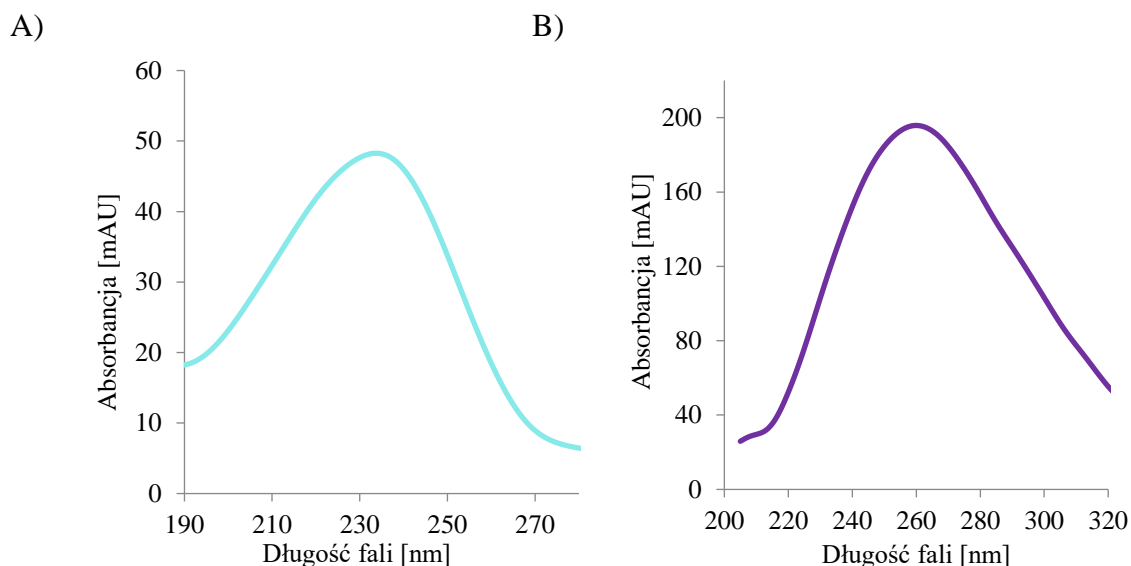
#### ***Wybór odpowiedniej kolumny chromatograficznej i analitycznej długości fali detekcji***

Dobór odpowiedniej kolumny chromatograficznej jest niezwykle istotny dla rozdzielania dużej liczby składników znajdujących się w płynach fizjologicznych oraz ich wykrycia i oznaczenia. Celem uzyskania jak najlepszych wyników rozdzielania chromatograficznego zbadano kilka różnych kolumn analitycznych, w tym: Aeris WIDEPORE XB-C18 (150×4,6 mm, 5 μm), Kinetex HILIC (100×4,6 mm, 2,6 μm), Poroshell (75×4,6 mm, 2,7 μm) i Zorbax SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm). Wybór poszczególnych kolumn był zdeterminowany ich specyficznymi właściwościami. Kolumna Aeris WIDEPORE umożliwia analizę próbek moczu i osocza bez uprzedniego ich odbiałczania [143]. Kolumna HILIC jest jedną z najczęściej stosowanych podczas rozwiązywania problemów retencyjnych analitów silnie polarnych [144] i ze względu na dużą polarność badanych związków oceniona została możliwość jej zastosowania. Kolumny Poroshell i Zorbax z wypełnieniem C18 różniły się między sobą długością oraz średnicą cząstek.

W celu uzyskania jak najlepszej rozdzielczości analitów dla każdej kolumny zbadano kilka rodzajów fazy ruchomej i wstępnie oceniono wpływ modyfikatorów organicznych, takich jak MeOH i MeCN. Celem przeprowadzonych eksperymentów było uzyskanie symetrycznych, wąskich, dobrze wykształconych, powtarzalnych pików w jak najkrótszym czasie analizy, a także zminimalizowanie zużycia modyfikatorów organicznych w fazie ruchomej. Najlepszą separację chromatograficzną z symetrycznymi kształtami pików TFV i Crn oraz powtarzalnymi czasami retencji uzyskano używając kolumny Zorbax SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm). Optymalne rozdzielnie między eluowanymi związkami otrzymano wykorzystując jako modyfikator organiczny MeCN z gradientowym trybem elucji. W przypadku zastosowania kolumny Poroshell sygnał chromatograficzny pojawiał się w postaci źle wykształconego i bardzo szerokiego pasma, zaś przy zastosowaniu kolumny HILIC każdorazowo obserwowano zmianę czasu retencji

piku pochodzącego od badanego analitu, nawet po bardzo długim kondycjonowaniu kolumny.

W przypadku metod chromatograficznych opartych na detekcji UV, wykorzystanie najbardziej odpowiednich długości fal ma kluczowe znaczenie dla wykrycia analitu i czułości metody. Dzięki zastosowaniu detektora wyposażonego w matrycę diodową możliwe było rejestrowanie kilku chromatogramów jednocześnie, przy różnych długościach fali. Przeanalizowano widma UV w wąskim zakresie obejmującym występowanie maksimów absorpcji dla Crn i TFV mieszczącym się odpowiednio od 190 do 270 nm i od 220 do 320 nm. Optymalne wartości analitycznych długości fal wyniosły odpowiednio 234 nm i 260 nm dla Crn i TFV, a otrzymane widma zaprezentowano na poniższym rysunku (Ryc. 8).



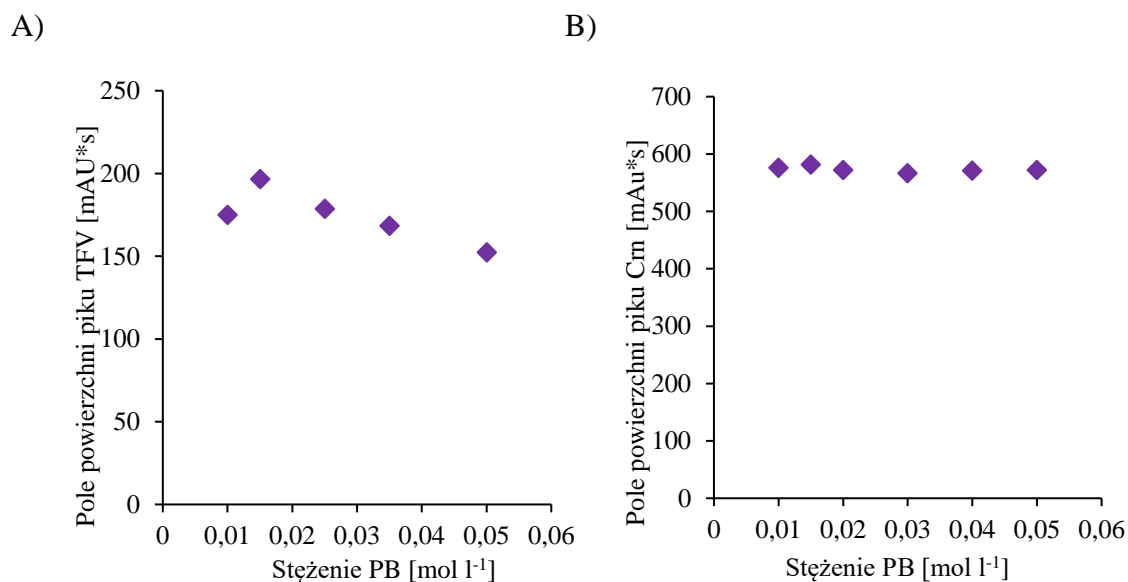
**Ryc. 8.** Widma Crn (A) i TFV (B) zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm), elucja izokratyczna 3% MeCN i 97% PB (0,01 mol l<sup>-1</sup>, pH 7), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml min<sup>-1</sup>.

### **Optymalizacja warunków rozdzielania chromatograficznego**

Ilości rozpuszczalników organicznych i nieorganicznych w fazie ruchomej są kluczowe z chromatograficznego, ekonomicznego i środowiskowego punktu widzenia. W celu zmniejszyć ilości toksycznych odpadów w prowadzonych analizach, zdecydowano się na użycie niskiego stężenia buforu fosforanowego (PB) i jak najmniejszej ilości MeCN. W tym celu przygotowano serię roztworów PB o stężeniu 0,01, 0,015, 0,02, 0,03, 0,04 i 0,05 mol l<sup>-1</sup> i pH równym 7. Wpływ stężenia buforu na

parametry chromatograficzne badano, zmieniając w kolejnych analizach stężenie wodnego składnika fazy ruchomej. Rozcieńczoną próbkę moczu wzbogaconą roztworem TFV o stężeniu  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$  poddawano analizie chromatograficznej, każdorazowo wprowadzając do układu po  $10 \mu\text{l}$  roztworu. Wszystkie analizy przeprowadzono w trybie izokratycznym, przy użyciu kolumny ZORBAX SB C-18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), MeCN jako organicznego składnika fazy ruchomej w stężeniu 3%, dla temperatury kolumny  $25^\circ\text{C}$  i przy objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej równym  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

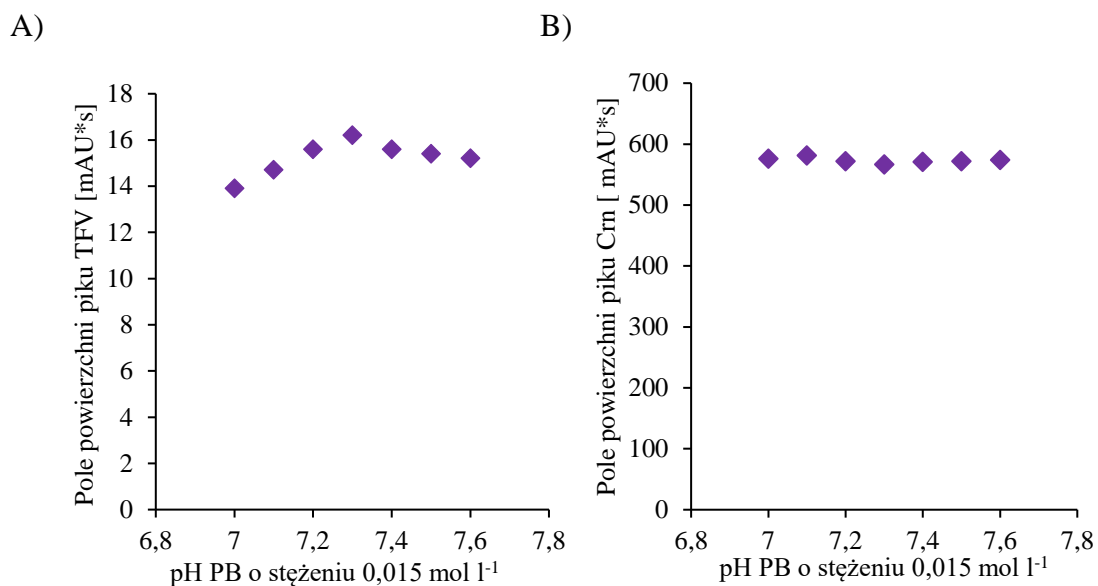
Jako kryterium decydujące o jakości rozdzielania pików Crn i TFV od innych składników próbki przyjęto parametr ilościowy, jakim jest pole powierzchni oraz jakościowy - wartości czasów retencji. Uzyskane chromatogramy stały się podstawą wykreślenia zależności wyżej wymienionych parametrów od stężenia PB w fazie ruchomej, które przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc. 9).



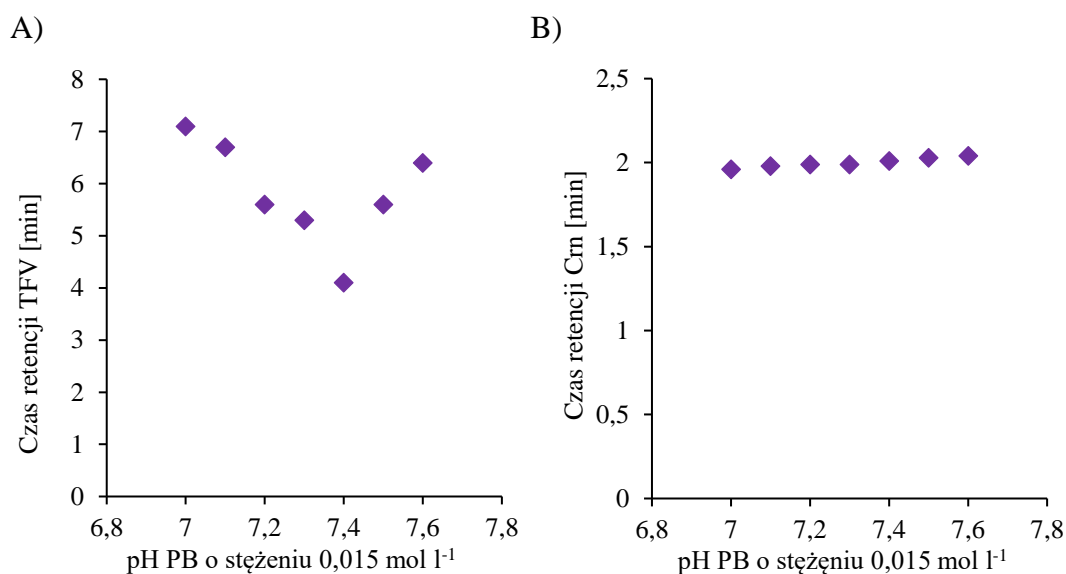
**Ryc. 9.** Wykresy przedstawiające wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzących od TFV (A) i Crn (B),  $n = 3$ .

Jak można zaobserwować na Ryc. 9, w przypadku TFV najbardziej satysfakcjonujące wyniki otrzymano dla stężenia  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ . Przy tym stężeniu zaobserwowano zwiększenie powierzchni otrzymywanych pików. Uzyskane wyniki wskazywały, iż dla Crn stężenie PB znajdującego się w fazie ruchomej, w badanym przedziale, nie miało znaczącego wpływu na pole powierzchni sygnału. Z tego względu do dalszych badań wykorzystywano PB o stężeniu  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , które skutkowało otrzymaniem dla TFV pików o największej powierzchni. Zmiany stężenia PB zawartego w fazie ruchomej, nie wpływały na zmianę wartości czasu retencji pików TFV i Crn.

Kolejnym z optymalizowanych parametrów była wartość pH PB wchodzącego w skład fazy ruchomej. Parametr ten jest narzędziem umożliwiającym kontrolowanie czasów retencji analitów. W tym celu przygotowano serię roztworów PB o stężeniu  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$  i zmiennymi wartościami pH. Wpływ pH PB na pole powierzchni piku i czas retencji sygnałów badano w zakresie od 7 do 7,6. W eksperymentach zastosowano pozostałe warunki separacji tożsame z badaniem stężenia PB w fazie ruchomej. Uzyskane wyniki przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc. 10 i 11).



**Ryc. 10.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B),  $n = 3$ .

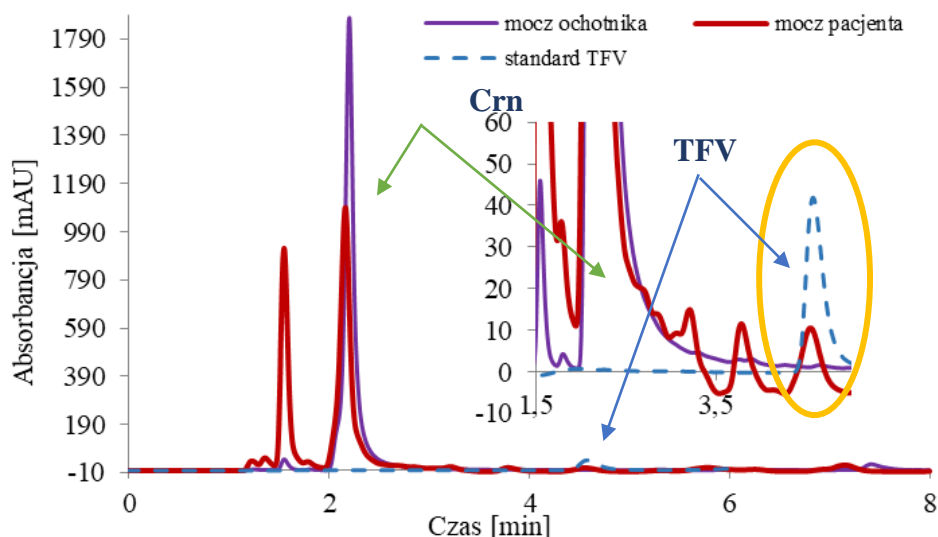


**Ryc. 11.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B),  $n = 3$ .

Na Ryc. 10 i 11 zaprezentowano odpowiednio zależności pola powierzchni jak i czasu retencji pików od pH buforu zawartego w fazie ruchomej. W toku prowadzonych badań okazało się, iż pH zastosowanej fazy ruchomej w niewielkim stopniu wpływa na pole powierzchni sygnału analitycznego pochodzącego od TFV, natomiast w znacznym stopniu wpływa na czas retencji, który jest najkrótszy dla pH 7,4 i wynosi zaledwie 4 minuty. W przypadku Crn, pH fazy ruchomej w zakresie 7 – 7,6 nie warunkuje różnic w analizowanych parametrach.

Przeprowadzone eksperymenty wskazały, że najlepszą jakość separacji poszczególnych analitów od pozostałych składników matrycy można uzyskać stosując jako składnik nieorganiczny fazy ruchomej PB o stężeniu  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,4, objętościową prędkość przepływu  $1 \text{ ml min}^{-1}$  oraz wykorzystując elucję gradientową o następującym profilu 0-6 min 2-4% MeCN, 6-7 min 4-2% MeCN i 7-8 min 2% MeCN. Dzięki zastosowaniu gradientu długości fali możliwa była optymalna detekcja obydwu składników próbki w jednym toku analizy. Ze względu na różnicę w maksimach absorpcji Crn i TFV wynoszącą 26 nm postanowiono zastosować zmianę analitycznej długości fali w trakcie trwania analizy. Gradient długości fali przedstawiał się następująco: 0-3 min 234 nm i 3-8 min 260 nm. Proponowane warunki detekcji umożliwiły precyzyjną identyfikację i integrację pików na chromatogramie. Dla Crn czas retencji wynosił 2,3 minuty, zaś dla TFV 4,5 minuty. Czas analizy próbki moczu wynosi 8 minut i jest krótszy w porównaniu z opublikowanym wcześniej protokołem [125].

Poniżej zaprezentowano chromatogramy (Ryc. 12) uzyskane w trakcie analiz standardu i próbek moczu. Jak można zauważyć w próbkach biologicznych otrzymano zadowalające wyniki rozdzielania badanych analitów od pozostałych składników moczu. Na chromatogramie otrzymanym dla moczu zdrowego ochotnika nie zaobserwowano sygnału w przedziale czasowym 4 – 5 min, co oznacza, że w matrycy nie występują składnik, które mogłyby interferować z pikiem TFV (czas elucji 4,5 min). Badania selektywności metody wykonano na sześciu próbkach moczu pochodzących od różnych osób.



**Ryc. 12.** Chromatogram otrzymany dla standardu TFV o stężeniu  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ , próbki moczu ochotnika nieprzyjmującego leku oraz moczu pacjenta poddanego terapii TFV w dawce 123 mg. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja gradientowa: 0-6 min 2-4% MeCN, 6-7 min 4-2% MeCN i 7-8 min 2% MeCN, PB ( $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4), temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

## 7.2. Przygotowanie próbki do analizy

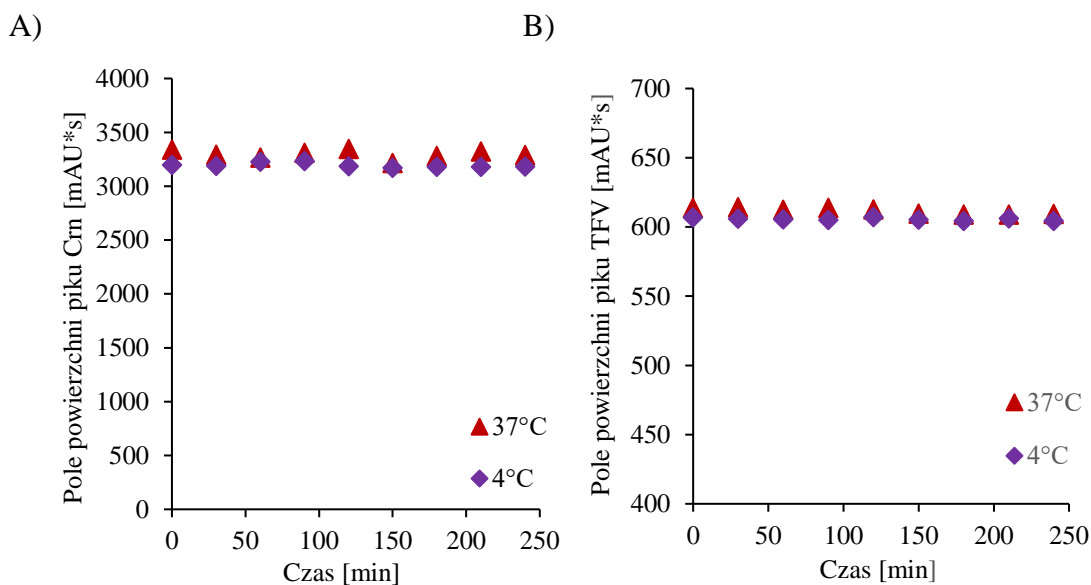
Założenia badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej skupiały się na opracowaniu metod analitycznych uwzględniających bardzo proste protokoły przygotowania próbek do analizy, jak i ich oznaczania techniką chromatografii cieczowej.

Mocz to matryca zawierająca dużo związków wydalanych z organizmu, w tym szkodliwych i niepotrzebnych dla organizmu pozostałości przemiany materii. Z tej przyczyny analiza tego rodzaju płynu biologicznego jest bardzo często problematyczna.

Podczas przeprowadzonych badań udowodniono, iż zastosowanie jedynie rozcieńczenia próbki moczu zezwala na wykonanie rzetelnych analiz. Próbki moczu rozcieńczano 10-rotnie przy użyciu PB o stężeniu  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$  (pH 7,4). Niewielkie zmiany pH próbek, powodowane ich naturą, nie wpływały na jakość przeprowadzanych analiz. Ze względu na dużą zawartość Crn w moczu, rozcieńczenie zapobiegało przeładowaniu kolumny chromatograficznej. Zastosowane warunki umożliwiły otrzymanie niskich granic wykrywalności i oznaczalności dla TFV, pomimo tak dużego rozcieńczenia próbki, co opisano w rozdziale 7.4.

### 7.3. Stabilność TFV i Crn w moczu

Z analitycznego punktu widzenia perspektywa zastosowania opracowanej metody w rutynowych analizach wymaga zbadania trwałości analitu w danej matrycy biologicznej. Eksperyment ten ma na celu określenie czy poszczególne etapy, zarówno przygotowania próbki jak i analizy, a także warunki przechowywania nie powodują zmian stężenia badanego związku. Każdą z próbek przeznaczoną do badań stabilności przygotowano poprzez dodanie do 50  $\mu\text{l}$  moczu 20  $\mu\text{l}$  roztworu standardu TFV o stężeniu  $750 \mu\text{g ml}^{-1}$  i uzupełniono do końcowej objętości 500  $\mu\text{l}$  PB o stężeniu  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,4. Próbki poddawane analizom, inkubowano w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  (temperatura rozmrażania próbek) oraz w  $37^\circ\text{C}$  (zbliżona do temperatury ciała człowieka). Próbki analizowano w trzech powtórzeniach w 30-minutowych odstępach czasowych przez okres 4 godziny. Otrzymane wyniki uśredniono i zaprezentowano na Ryc. 13.

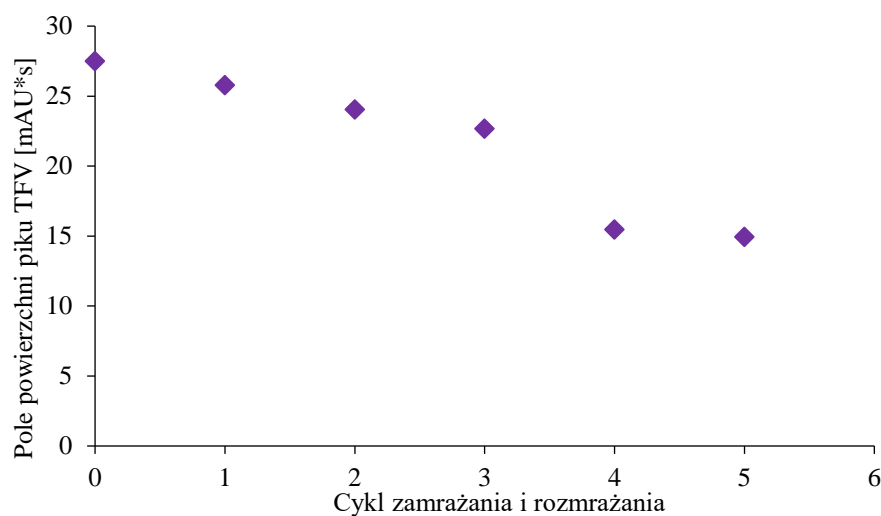


**Ryc. 13.** Stabilność Crn (A) i TFV (B) w moczu w temperaturze 37 i  $4^\circ\text{C}$  w czasie 240 minut,  $n= 3$  [142].

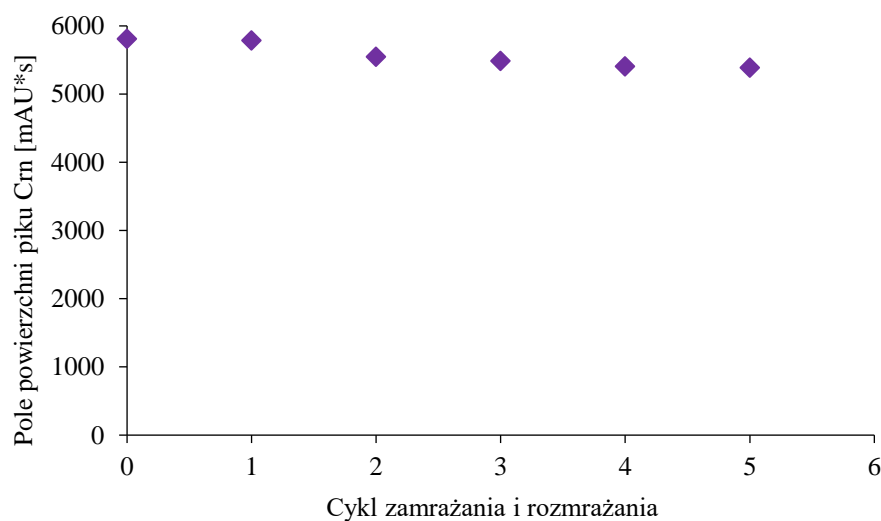
Otrzymane doświadczalnie wartości wykazały, iż zarówno TFV jak i Crn są stabilne przez okres 240 min w moczu w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  i  $37^\circ\text{C}$ , bez zauważalnej zmiany stężenia w obydwu przypadkach. Różnice pomiędzy wartościami początkowymi a końcowymi w przypadku Crn wynosiły 0,4 i 1,0% odpowiednio dla temperatury 4 i  $37^\circ\text{C}$ , zaś dla TFV 0,2 i 0,4%.

W ramach badania trwałości analitów przeprowadzono test cyklicznego zamrażania ( $-20^\circ\text{C}$ ) i rozmrażania ( $4^\circ\text{C}$ ) próbek moczu. Próbkę moczu pochodzącego od zdrowego pacjenta wzbogacono 20  $\mu\text{l}$  roztworu TFV o stężeniu  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  zamrażano

i rozmrażano w 5 cyklach. Każdą z analizowanych próbek przygotowywano poprzez rozcieńczenie 50  $\mu\text{l}$  moczu 430  $\mu\text{l}$  buforu pochodzącego z fazy. Na Ryc. 14 i 15 zaprezentowano otrzymane zależności trwałości analitów.



**Ryc. 14.** *Stabilność TFV w próbce moczu przy kilkukrotnym rozmrożeniu w 4°C i zamrożeniu w -20°C, n= 3.*



**Ryc. 15.** *Stabilność Crn w próbce moczu przy kilkukrotnym rozmrożeniu w 4°C i zamrożeniu w -20°C, n= 3.*

Otrzymane wyniki wskazują, iż stopień strat TFV w próbkach spowodowany wielokrotnym rozmrażaniem i zamrażaniem próbek badanych jest znaczący i wynika z degradacji analitu. Pierwsze rozmrożenie próbki wywołało spadek poziomu TFV o 5,6%, zaś dla Crn tylko o 0,4%. Po dwóch cyklach rozmrożenia w 4°C i zamrożenia w -20°C zawartość TFV w próbce spadła o ponad 11%, a Crn o 5%. Po trzecim cyklu zawartość TFV zmalała o około 17%, zaś zawartość Crn została stabilna w stosunku do



2 cyklu i jednocześnie mniejsza o 5,5% w stosunku do wartości początkowej. Z każdym kolejnym cyklem zamrożenia i rozmrożenia zawartość TFV ulegała zmniejszeniu. Obserwacje zdecydowanie wskazują, że próbki wykorzystywane do badań ilościowych należy poddać analizie natychmiast po pobraniu lub co najwyżej po dwóch ich rozmrożeniach.

Czas od chwili pobrania próbki moczu do momentu jej analizy to z reguły kilka godzin. Otrzymane wyniki stabilności oraz cyklicznego zamrażania i rozmrażania jednoznacznie wskazują na możliwość zbierania dużej ilości próbek w celu ich późniejszej analizy. Należy jednak uwzględnić, iż źle zabezpieczony i przechowywany materiał biologiczny ulegnie zniszczeniu, a konsekwencjami wynikającymi z tego będą niezetelne wyniki badań. Przeprowadzone eksperymenty, jak również otrzymane wyniki wyjaśniają wątpliwości dotyczące działania czynników zewnętrznych na trwałość badanych związków.

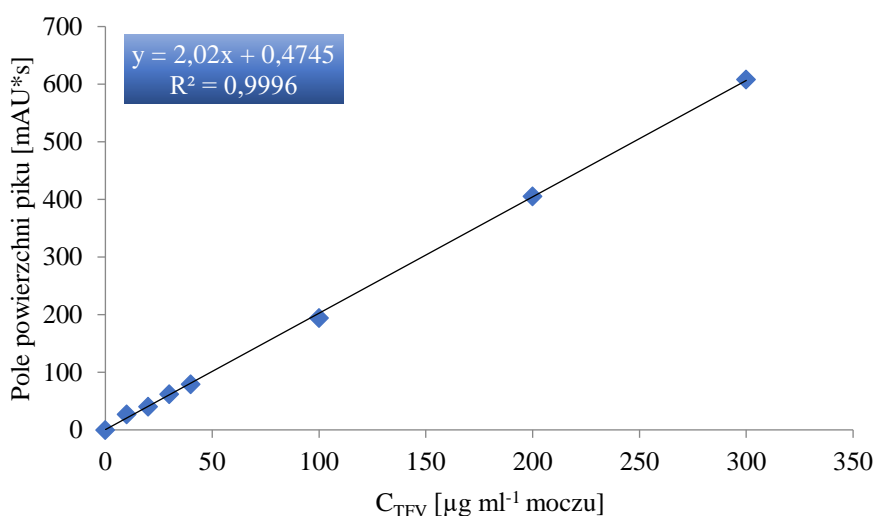
#### 7.4. Walidacja metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn

Po identyfikacji analitów i zoptymalizowaniu warunków separacji przystąpiono do kalibracji metody. Próbki do sporządzenia krzywych kalibracyjnych przygotowano poprzez dodanie do 50  $\mu\text{l}$  moczu 425  $\mu\text{l}$  roztworu PB ( $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4), 20  $\mu\text{l}$  roztworu TFV o odpowiednim stężeniu (25, 50, 75, 100, 250, 500, 750  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) oraz 5  $\mu\text{l}$  roztworu Crn o stężeniu 1, 5, 15, 25, 50, 100, 200, 300  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ . Tak sporządzono trzy serie pomiarowe próbek, które poddawano analizom chromatograficznym wprowadzając każdorazowo do kolumny po 10  $\mu\text{l}$  roztworu. Na podstawie uzyskanych uśrednionych wyników wykreślono krzywe kalibracyjne. Wartości współczynników korelacji dla każdej z krzywych są bliskie jedności (tabela 8), co świadczy o prawidłowym doborze zakresu liniowości metody.

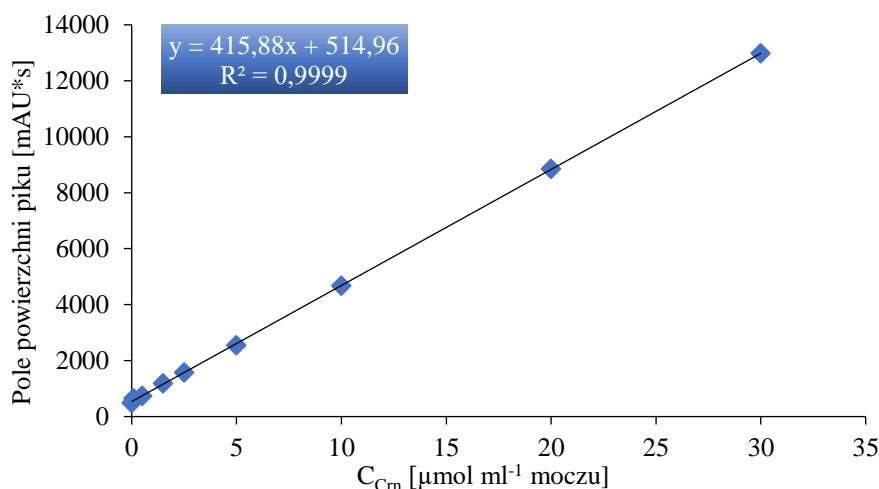
**Tabela 8.** Wyniki procedury walidacyjnej metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach moczu,  $n=3$  [142].

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
TFV [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ mocz]	10 – 300	$y=2,02+0,47x$	0,9998	1,1	6,1	96,0	108,0
Crn [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ mocz]	0,1 – 30	$y=415,88+514,96x$	0,9999	0,4	3,1	99,3	111,1

Zależności pola powierzchni pików TFV i Crn od stężenia przedstawiono na wykresach poniżej (Ryc. 16,17).



**Ryc. 16.** Krzywa kalibracyjna dla TFV sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia TFV w próbce moczu,  $n = 3$ .



**Ryc. 17.** Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od jej stężenia w próbce moczu,  $n = 3$ .

Wyznaczono również precyzję i dokładność metody. Precyzję wyrażono jako względne odchylenie standardowe (RSD), podczas gdy dokładność wyrażono jako procentowy odzysk użytego analitu. Wewnątrz-dniowe wartości precyzji i dokładności wyznaczono na podstawie pomiarów wykonanych tego samego dnia w trzech powtórzeniach w próbkach moczu wzbogaconych wzorcowymi roztworami. Zbadano trzy stężenia w całym zakresie krzywych kalibracyjnych: jedno w pobliżu granicy

oznaczalności, jedno w pobliżu środka i jedno w pobliżu górnego końca krzywych kalibracyjnych. Między-dniowe wartości precyzji i dokładności oceniano w trzech kolejnych dniach w ciągu tygodnia. Obliczone wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej opracowanej metody uzyskane dla wybranych stężeń przedstawiono w tabeli 9.

**Tabela 9.** Wyniki precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej otrzymane dla próbek moczu wzbogaconego TFV, n= 3 [142].

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
TFV [µg ml <sup>-1</sup> moczu]	10	2,3	5,8	95,9	105,7
	40	4,1	8,1	97,5	113,4
	300	1,9	4,3	100,3	96,1
Crn [µmol ml <sup>-1</sup> moczu]	0,1	4,2	6,8	111,4	120,1
	2,5	1,7	5,4	100,6	104,4
	30	3,7	6,1	99,3	108,9

Dokładność wewnątrz-dniowa wahała się w granicach od 95,9 do 100,3% dla TFV i od 99,3 do 111,4% dla Crn. Dokładność między-dniowa oscylowała w granicach od 96,1 do 113,4% dla TFV i od 104,4 do 120,1% dla Crn. Precyzja metody mieściła się natomiast w przedziale od 1,9 do 4,1% dla TFV i 1,7 do 4,2 dla Crn (wewnątrz-dniowa) oraz od 4,3 do 5,8 dla TFV i 5,4 do 6,8 dla Crn (między-dniowa).

Wartości LOD i LOQ opracowanej metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w moczu wyznaczono eksperymentalnie na podstawie stosunku sygnału do szumu przyjmując kryterium sygnał trzy razy większy od szumu dla LOD i dziesięć razy większy od szumu dla LOQ. W przypadku TFV wartości te wyznaczano na próbkach moczu, podczas gdy dla Crn w roztworze soli fizjologicznej (0,9% NaCl w 10 mmol l<sup>-1</sup> PB, pH 7,4). Uzyskane wartości LOD i LOQ wynoszą odpowiednio 4 µg ml<sup>-1</sup> i 8 µg ml<sup>-1</sup> dla TFV oraz 0,03 µmol ml<sup>-1</sup> i 0,1 µmol ml<sup>-1</sup> dla Crn.

### 7.5. Oznaczenie zawartości TFV w moczu i wyznaczenie profilu farmakokinetycznego

Opracowany i zwalidowany protokół analityczny z powodzeniem zastosowano do oznaczenia zawartości TFV i Crn w próbkach moczu pacjentów poddanych terapii preparatem farmaceutycznym Viread jednego z dawką 123 mg i dwóch pacjentów

z dawką 245 mg. Preparat Viread zawiera TFV w postaci proleku fumaranu tenofowiru dizoproksylu. W celu oznaczenia zawartości TFV do 50 µl próbki moczu dodawano 450 µl PB o stężeniu 0,015 mol l<sup>-1</sup> i pH 7,4. Tak rozcieńczoną próbkę poddawano analizom chromatograficznym zgodnie z opracowanym i zoptymalizowanym protokołem analizy.

Pomimo tego, iż próbki moczu były oddawane w różnych interwałach czasowych po zażyciu preparatu farmakologicznego (1, 2, 4, 6, 8 h – przy dawce 123 mg) oraz (4, 8 i 12 h - przy dawce 245 mg) możliwe było wyznaczenie profilu farmakokinetycznego wydalania TFV z organizmu wraz z moczem dla każdej z osób poddanej terapii TFV. Uzyskane wyniki zaprezentowano w tabeli 10.

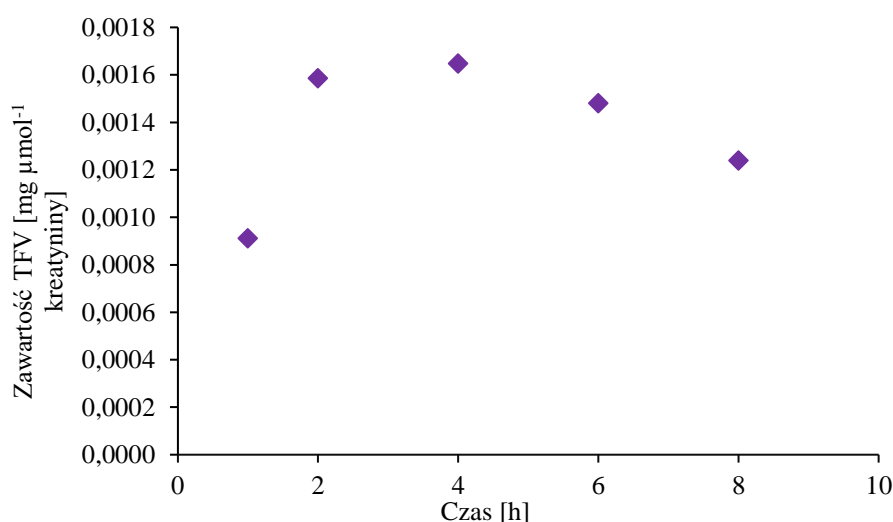
Aby wyeliminować błędy wskazań, związane z różnym składem moczu i jego rozcieńczeniem, zawartości TFV w moczu normalizowano względem Crn. Dzięki opracowanemu protokołowi jest to możliwe w trakcie trwania jednej analizy, co znacznie ułatwia cały tok analityczny (tabela 10). Dodatkowo jednoczesna analiza minimalizuje zużycie próbki oraz produkcję odpadów laboratoryjnych. Nie jest więc konieczne normalizowanie zawartości TFV względem Crn przy użyciu innej metody analitycznej.

**Tabela 10.** Farmakokinetyka TFV wydalanego z moczem po przyjęciu leku w dawce 123 mg (pacjent 1) i 245 mg (pacjent 2 i 3), n= 3.

Czas [h]	Pacjent 1		Pacjent 2		Pacjent 3	
	C <sub>TFV</sub> [mg ml <sup>-1</sup> ]	C <sub>TFV</sub> [mg µmol <sup>-1</sup> Crn]	C <sub>TFV</sub> [mg ml <sup>-1</sup> ]	C <sub>TFV</sub> [mg µmol <sup>-1</sup> Crn]	C <sub>TFV</sub> [mg ml <sup>-1</sup> ]	C <sub>TFV</sub> [mg µmol <sup>-1</sup> Crn]
1	0,05	0,0009				
2	0,07	0,0016				
4	0,16	0,0016	0,04	0,0056	0,10	0,0056
6	0,09	0,0016				
8	0,04	0,0012	0,09	0,0041	0,08	0,0051
12			0,07	0,0041	0,12	0,0049

Jak można zauważyć w tabeli 10, zawartość TFV u każdego z pacjentów różni się. Jest to związane z jakością i szybkością metabolizmu organizmu, jak i przyjmowaną dawką terapeutyczną leku [118]. Na rycinie 18 dla pacjenta 1 wyznaczono profil wydalania TFV obejmujący przedział czasowy do 8 godzin od zażycia leku. Dla pozostałych pacjentów trzy punkty pomiarowe to za mało, aby można było wyznaczyć podobną zależność. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że największa ilość TFV

została wydalona w ciągu 2–4 godzin po przyjęciu leku i stopniowo zmniejszała się do ósmej godziny (Ryc.18, tabela 10, wyniki normalizowane na Crn). Należy podkreślić, że mając ograniczoną liczbę pacjentów, nie możliwe jest zaprezentowanie danych statystycznych do omówienia i wykazania dobowego trendu wydalania TFV z moczem. Jednak dane walidacyjne jednoznacznie wskazują, że opracowana metoda byłaby przydatna do przeprowadzenia tego typu badań.



**Ryc. 18.** Profil farmakokinetyczny wydalania TFV z moczem w czasie 8 h po zażyciu przez Pacjenta 1 preparatu farmaceutycznego Viread w dawce 123 mg,  $n = 3$  [142].

Dane walidacyjne jednoznacznie wskazują, że zaproponowana procedura analityczna może być użytecznym narzędziem podczas rutynowego oznaczania TFV w moczu. Brak konieczności skomplikowanego przygotowania próbki oraz prosta analiza końcowa sugerują, iż może to być metoda konkurencyjna do innych chromatograficznych protokołów oznaczania TFV w moczu [125-127].

## **8. OPRACOWANIE METODY JEDNOCZESNEGO OZNACZANIA TFV I CRN W OSOCZU KRWI CZŁOWIEKA**

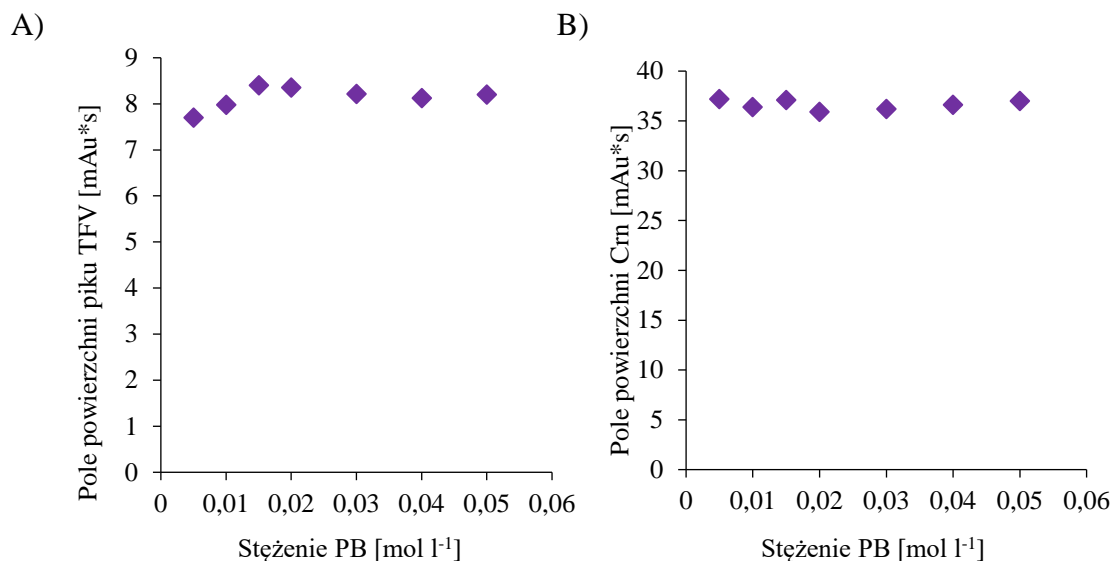
Ekspozycja na czynniki chorobotwórcze przenoszone przez krew stanowi poważne ryzyko dla pracowników laboratorium. Szczególne zagrożenie dla laborantów stanowią wirusy hepatotropowe oraz wirus HIV. Pożądanym jest więc dostarczanie nowych, prostych protokołów analitycznych umożliwiających jak najkrótszy kontakt z materiałem zakaźnym. Prosta procedura przygotowania próbki do analizy zapewnia krótszą ekspozycję zawodową związaną z czynnikami chorobotwórczymi. Pomimo faktu wysokiego ryzyka zakażenia przy użyciu próbek krwi, wcześniej opublikowane

doniesienia opisują głównie metody oznaczania TFV w osoczu [28,33,110-124]. Co więcej, żaden z dotychczas opisanych protokołów nie daje możliwości jednoczesnego monitorowania stężenia TFV i Crn w osoczu. Niniejsza metoda jest pierwszą chromatograficzną procedurą jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach osocza.

### **8.1. Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego**

Opracowując nową metodę oznaczania wybranych analitów w płynach biologicznych postawiono z jednej strony na jej innowacyjność, czyli jednoczesną separację i identyfikację Crn i TFV, zaś z drugiej na jak największą prostotę, która pozwoli na jej wykorzystanie w innych laboratoriach analitycznych.

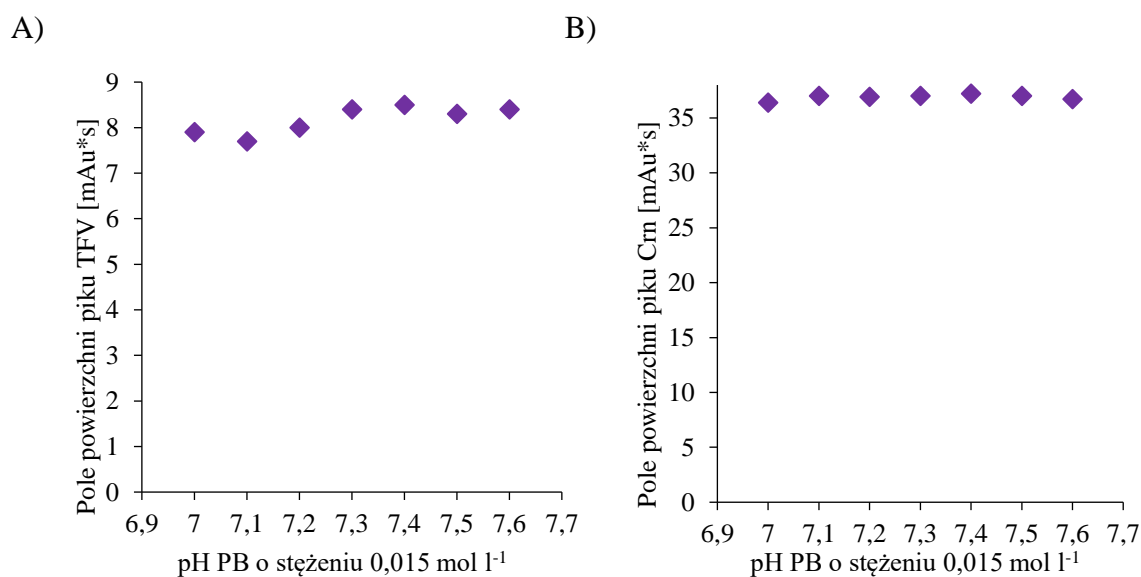
Badania chromatograficzne, prowadzone były z wykorzystaniem kolumny ZORBAX SB C18, wybranej podczas optymalizacji warunków separacji dla próbek moczu. Optymalizację parametrów chromatograficznych przeprowadzono na próbkach osocza wzbogaconych analitem przy zastosowaniu fazy ruchomej zawierającej 2% MeCN i 98% buforu fosforanowego o różnym stężeniu i pH, natężeniu prędkości przepływu  $1 \text{ ml min}^{-1}$  oraz temperatury kolumny  $25^\circ\text{C}$ . Ponowne przeprowadzenie badań było podyktowane zmianą matrycy, w której będą oznaczane TFV i Crn. Zbadano wpływ pH i stężenia PB, będącego składnikiem fazy ruchomej na pola powierzchni i czasy retencji sygnałów pochodzących od TFV i Crn. Stężenie PB badano w większym zakresie od  $0,005$  do  $0,05 \text{ mol l}^{-1}$ , dla odbiałczonych próbek osocza wzbogaconych roztworem TFV o stężeniu  $10 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ . Supernatant poddawano analizie chromatograficznej, każdorazowo wprowadzając do układu po  $10 \text{ }\mu\text{l}$  roztworu. Na podstawie uzyskanych chromatogramów wykreślono poniższe zależności (Ryc. 19).



**Ryc. 19.** Wykresy przedstawiające wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzącego od TFV (A) i Crn (B),  $n=3$ .

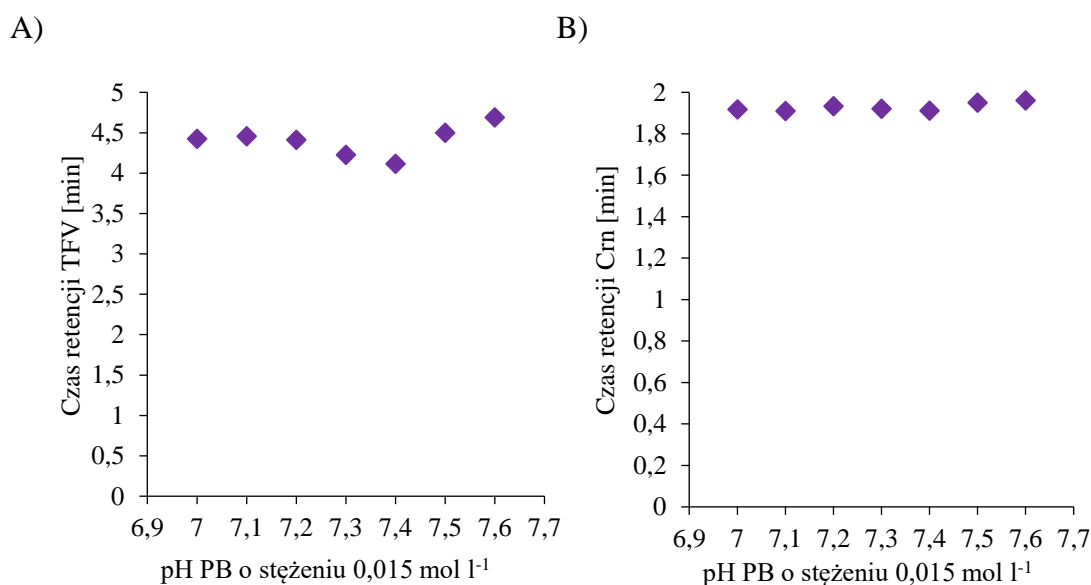
Na podstawie otrzymanych zależności pól powierzchni pików od stężenia PB w fazie ruchomej stwierdzono, że stężenie buforu w badanym zakresie od 0,005 do 0,05 mol l<sup>-1</sup> nie wpływa znacząco na zmianę kształtu pików Crn oraz jego pole powierzchni, zaś dla TFV pole powierzchni wzrasta w niewielkim stopniu, a największy sygnał otrzymano dla wartości 0,015 mol l<sup>-1</sup>, dlatego też do dalszych analiz wybrano to stężenie.

Wartości pH będącego składnikiem fazy ruchomej PB sprawdzano w zakresie od 7 do 7,6 (Ryc. 20).



**Ryc. 20.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B),  $n=3$ .

Największe i najbardziej symetryczne piki dla TFV uzyskano dla pH 7,4. Dodatkowo zaobserwowano, że czas retencji TFV zmienia się w niewielkim stopniu wraz ze zmianą pH i był on najkrótszy dla pH 7,4 (Ryc. 21).



**Ryc. 21.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czas retencji sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B),  $n=3$ .

Zawartość modyfikatora organicznego (MeCN) w fazie ruchomej badano dla zakresu od 2% do 5% z zastosowaniem elucji izokratycznej. Analiza otrzymanych chromatogramów pozwoliła stwierdzić, że najlepszą separację dla obydwu analitów zapewnia użycie 2% MeCN w fazie ruchomej. Zwiększanie zawartości modyfikatora organicznego skutkowało pogorszeniem rozdzielczości sygnałów, co w przypadku Crn wpływało na brak jej jednoznacznej identyfikacji, poprzez koelucję z sygnałem pochodzącym z osocza. Prowadzenie analiz w trybie izokratycznym przy wykorzystaniu fazy ruchomej złożonej z 2% MeCN i 98% PB o stężeniu 0,015 mol l<sup>-1</sup> i pH 7,4 pozwoliło na monitorowanie w jednym toku analitycznym zawartości zarówno Crn jak i TFV.

Dzięki zastosowaniu gradientu długości fali możliwa była optymalna detekcja obu składników próbki. Gradient długości fali przedstawiał się następująco: 0-2,5 min 234 nm, 2,5-6 min 260 nm.

## 8.2. Przygotowanie próbki do analizy

Osocze człowieka jest zasadniczym składnikiem krwi odpowiedzialnym za transport produktów przemiany materii w organizmie. Analiza tego rodzaju materiału biologicznego dostarcza wiadomości związanych ze stanem biochemicznym pacjenta i jest ona niezbędna w diagnostyce klinicznej. Osocze jest bardzo złożoną matrycą,



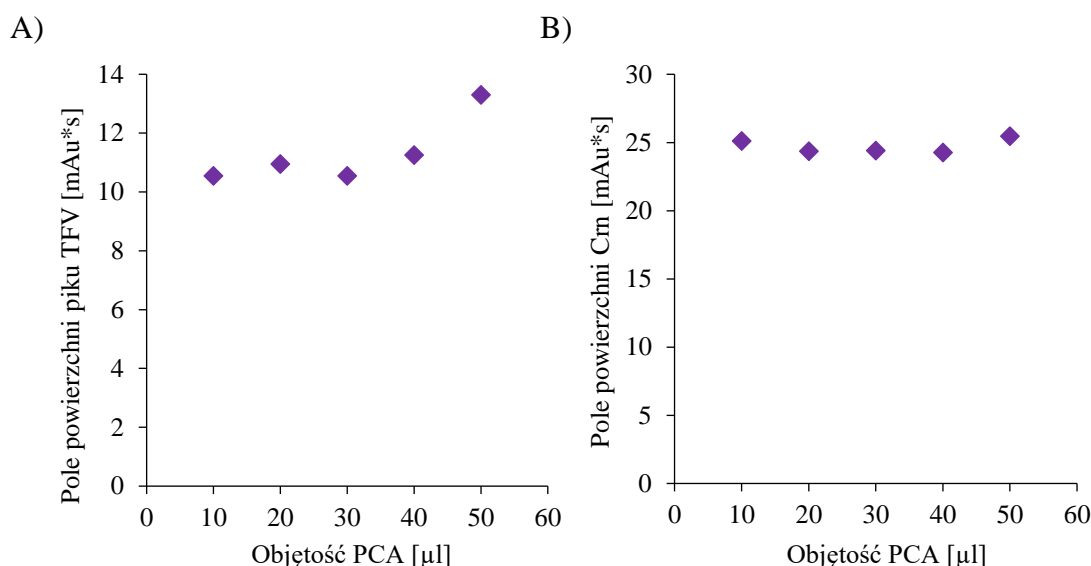
składającą się z wielu organicznych i nieorganicznych związków, co sprawia, że jego analiza nie jest łatwa.

Deproteinizacja jest często etapem niezbędnym w trakcie analizy próbek zawierających białka. W procesie odbiałczania mogą zmienić się właściwości badanych związków, w tym mogą one ulegać rozkładowi. Niektóre z oznaczanych analitów mogą wiązać się z białkami, a następnie w etapie deproteinizacji być z nimi usuwane, co prowadzi do obniżenia czułości opracowywanych metod. Dodatkowo, białko obecne w próbce może znacząco utrudnić bądź uniemożliwić separację chromatograficzną. W niektórych przypadkach zniszczyć filtry znajdujące się w układzie chromatograficznym, a także zablokować przepływ eluentu przez kolumnę, przez co staje się ona nieużyteczna.

Z tego powodu w pierwszym etapie eksperymentów z zastosowaniem osocza podjęto próby odbiałczania próbek z wykorzystaniem specjalnych filtrów membranowych typu „cut off” o wielkości porów w membranie 30 kD. W tym celu na filtry wprowadzano próbkę zawierającą 100  $\mu\text{l}$  osocza, 10  $\mu\text{l}$  roztworu TFV o stężeniu 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz 90  $\mu\text{l}$  PB (0,015  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 7,4). Próbkę przygotowano w 3 seriach. Odwirowywano w temperaturze 4°C przez 10 minut stosując prędkość wirowania 12000  $\text{obr min}^{-1}$ . Po odwirowaniu 50  $\mu\text{l}$  przesącza przenoszono do fiolki do HPLC, a 10  $\mu\text{l}$  poddawano analizie chromatograficznej stosując zoptymalizowane warunki chromatograficzne.

Uzyskane dla badanych filtratów wyniki były niepowtarzalne. Rozrzuty pomiędzy wartościami pól powierzchni sygnałów TFV wynosiły aż 60% dla tego samego stężenia. Ze względu na dużą rozbieżność wyników, zdecydowano o użyciu kwasu chlorowego(VII) o stężeniu 3  $\text{mol l}^{-1}$  (PCA), powszechnie stosowanego odczynnika strącającego białko.

Zoptymalizowano objętość użytego PCA do strącania białek. W tym celu do 50  $\mu\text{l}$  osocza, dodawano 10  $\mu\text{l}$  roztworu TFV o stężeniu 15  $\mu\text{g ml}^{-1}$  5,0  $\mu\text{l}$  Crn o stężeniu 0,02  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ , kolejno 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$ , 50  $\mu\text{l}$  PCA o stężeniu 3  $\text{mol l}^{-1}$  i próbki uzupełniano do końcowej objętości 500  $\mu\text{l}$  wykorzystując 0,015  $\text{mol l}^{-1}$  PB o pH 7,4. Próbkę odwirowywano przez 10 min w temperaturze 10°C i prędkości 15000  $\text{obr min}^{-1}$ . Po odwirowaniu 100  $\mu\text{l}$  supernatantu przenoszono do fiolki do HPLC, a 10  $\mu\text{l}$  poddawano analizie chromatograficznej. Otrzymane wyniki umieszczono na Ryc. 22.

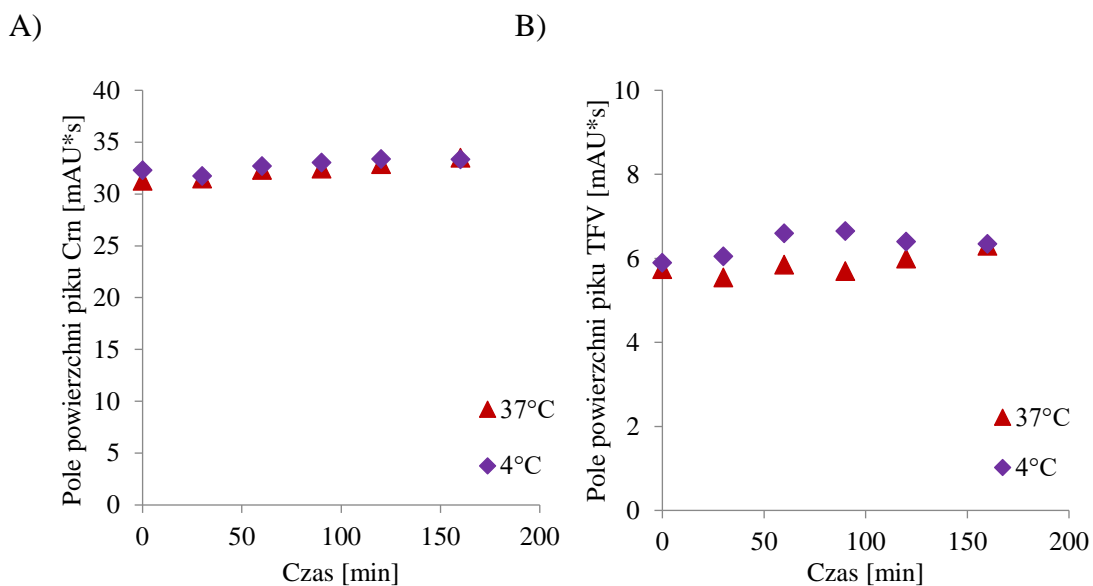


**Ryc. 22.** Wpływ objętości odczynnika deprotenizującego białko na zawartość TFV (A) i Crn (B) w próbkach osocza,  $n = 3$ .

Otrzymane rezultaty jednoznacznie wskazują, iż zastosowanie odczynnika strącającego białka w stosunku 1:1 z osoczem (v/v) pozwala na całkowite usunięcie białka z osocza i otrzymanie największych sygnałów pochodzących od obydwu analitów. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły ustalić optymalne warunki chromatograficzne, jak i prostą procedurę przygotowania próbki do analizy. Umożliwiły one uzyskanie symetrycznych, dobrze wykształconych sygnałów analitycznych pochodzących od Crn i TFV, a także ich bezproblemową identyfikację i integrację.

### 8.3. Badania trwałości TFV i Crn w osoczu krwi człowieka

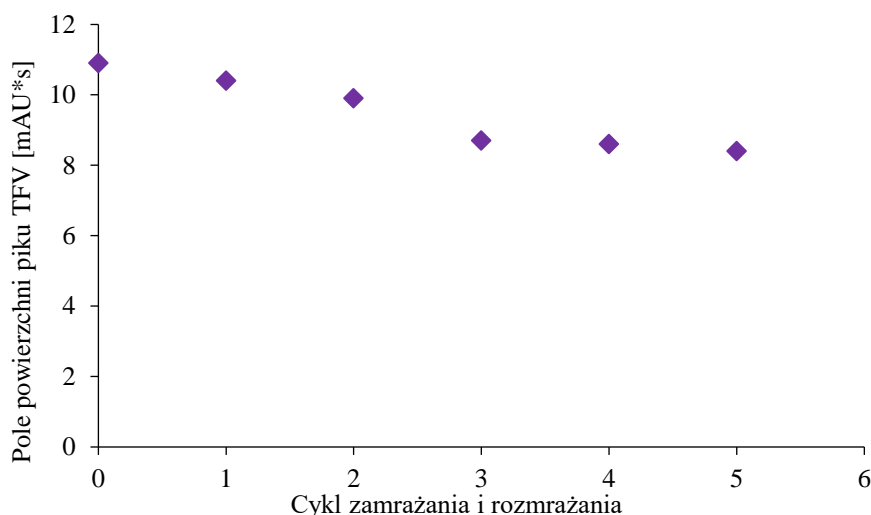
Kolejnym etapem badań związanych z opracowaniem metody oznaczania TFV i Crn w próbkach osocza było zbadanie stabilności analitów w materiale biologicznym w danych warunkach i określonym czasie. Badania trwałości prowadzono przez 160 minut, inkubując osocze w temperaturze 37 i 4°C, a próbki pobierano do badań w interwałach 30 minutowych. Materiał do badań przygotowano poprzez wzbogacenie 50 μl osocza 10 μl TFV o stężeniu 7,5 μg ml<sup>-1</sup> oraz 5 μl roztworu Crn o stężeniu 0,1 μmol ml<sup>-1</sup>, następnie dodawano 50 μl PCA o stężeniu 3 mol l<sup>-1</sup> i uzupełniano do końcowej objętości 500 μl wykorzystując 0,015 mol l<sup>-1</sup> PB o pH 7,4. Próbkę odwirowywano przez 10 min w temperaturze 10°C i prędkości 15000 obr min<sup>-1</sup>. Otrzymane rezultaty przedstawiono na rycinach poniżej (Ryc. 23).



**Ryc. 23.** Stabilność Crn (A) i TFV (B) w osoczu w temperaturze 37 i 4°C w czasie 160 minut,  $n=3$  [142].

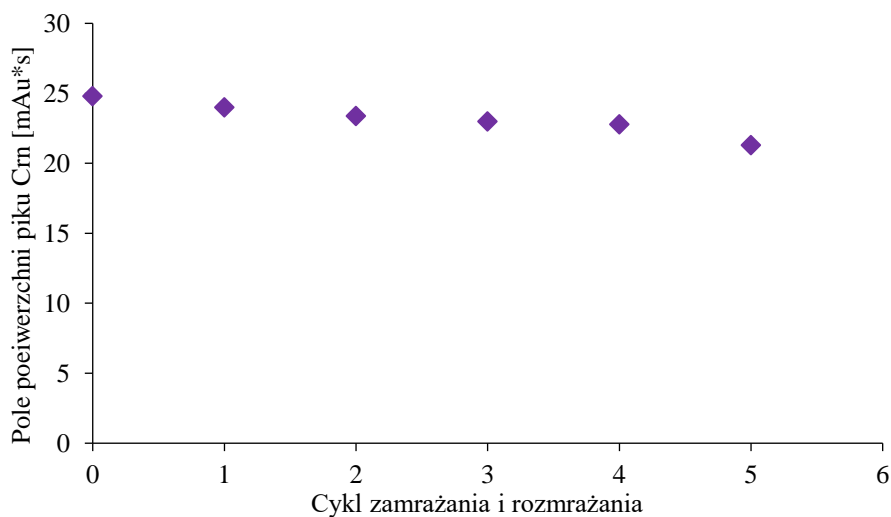
Eksperymenty wykazały, że TFV i Crn są stabilne przez 160 min w próbkach osocza w temperaturze 4 i 37°C bez znaczącej zmiany stężenia dla obydwu analitów. Obliczone różnice w stężeniu początkowym i końcowym dla Crn w próbkach osocza przechowywanych w 4 i 37°C wynosiły odpowiednio 2,0% i 2,6%, a dla TFV, 4,7% i 4,5%.

Przeprowadzone badania dotyczące wpływu procesu zamrażania i rozmrażania próbki na poziom analitów były kolejnym etapem eksperymentów. Próbki do analizy przygotowano w analogiczny sposób jak do badań stabilności w czasie. Wykonane analizy wykazały, że pięciokrotne zamrażanie w temperaturze -20°C i rozmrażanie w 4°C próbki osocza wzbogaconej TFV spowodowało znaczną degradację analitu. W ciągu pierwszego cyklu ubytek TFV wyniósł 4,6%, zaś w drugim cyklu ponad 9%. Wykonanie następnych cykli powodowało kolejne spadki zawartości TFV w porównaniu z poziomem wyjściowym i po 5 cyklu rozmrożenia ubytek w stężeniu TFV wyniósł 22,6% (Ryc. 24).



**Ryc. 24.** *Trwałość TFV w próbce osocza przy kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i rozmrażaniu w  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 3$ .*

Uzyskane wyniki dla Crn wykazały, że po pierwszym cyklu rozmrażania próbki spadek zawartości związku wynosi 3,4%, po drugim 5,8%, a po piątym degradacja analitu jest na poziomie 14,2% (Ryc. 25). Uzyskane wyniki wskazują na to, iż Crn obecna w próbkach osocza jest bardziej stabilna niż TFV w przypadku cyklicznego zamrażania i rozmrażania próbek.



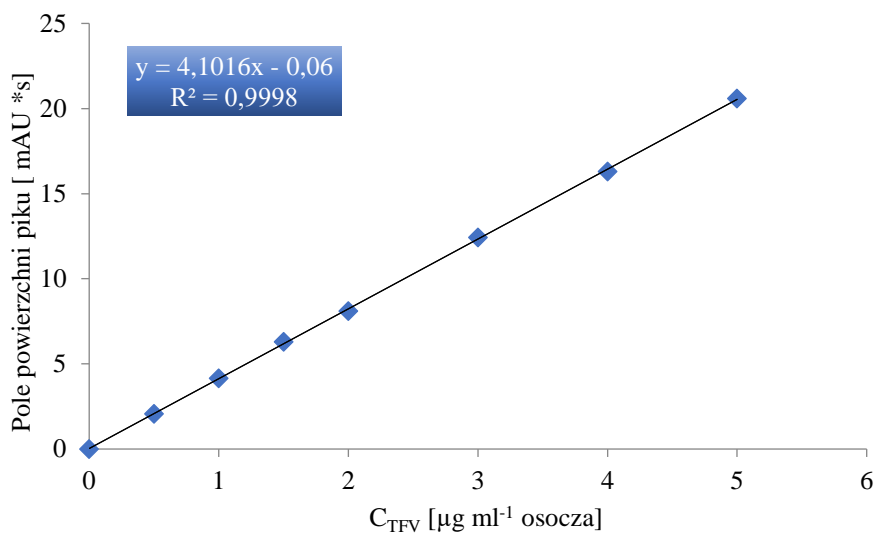
**Ryc. 25.** *Trwałość Crn w próbce osocza przy kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i rozmrożeniu w  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 3$ .*

Obserwacje z przeprowadzonych eksperymentów zdecydowanie wskazują, że próbki osocza należy poddać analizie natychmiast po pobraniu lub co najwyżej po jednym cyklu ich rozmrożenia. Przechowywanie prób w różnych temperaturach wiąże się

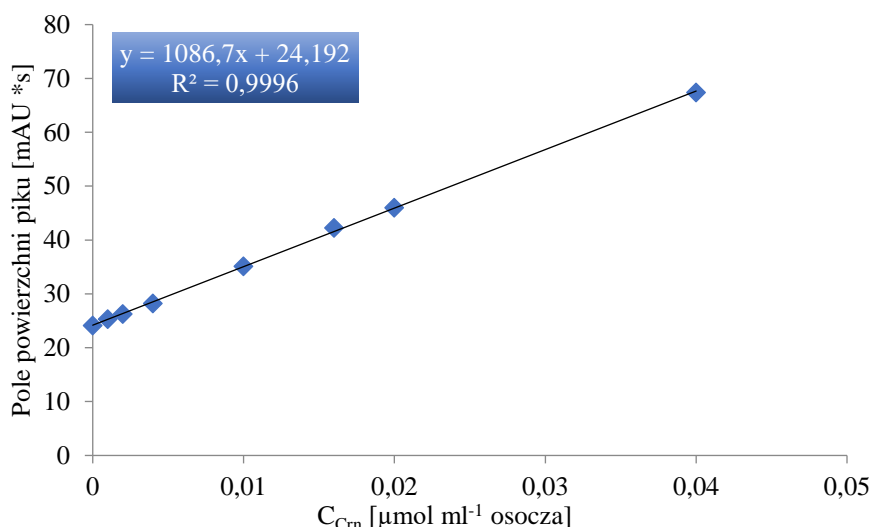
z niewielką stratą analitu w czasie 5 godzin. Częste rozmrażanie i zamrażanie materiału biologicznego prowadzi do znaczącego rozkładu TFV o ponad 20% wartości wyjściowej.

#### 8.4. Walidacja opracowanej metody

Po dobraniu odpowiednich warunków rozdzielania analitów przystąpiono do procesu walidacji metody. Sporządzono krzywe kalibracyjne dla próbek osocza przygotowanych w następujący sposób: 50  $\mu\text{l}$  osocza wzbogacano 10  $\mu\text{l}$  TFV o stężeniu 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz 5  $\mu\text{l}$  roztworu Crn o stężeniu 0,01, 0,02, 0,04, 0,1, 0,16, 0,2, 0,4  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ , następnie dodawano 50  $\mu\text{l}$  PCA o stężeniu 3  $\text{mol l}^{-1}$  i uzupełniano do końcowej objętości 500  $\mu\text{l}$  wykorzystując 0,015  $\text{mol l}^{-1}$  PB o pH 7,4. Próbkę odwirowywano przez 10 min, w 4°C, przy prędkości 15000 obr  $\text{min}^{-1}$ . Każdą z próbek przygotowano w trzech seriach pomiarowych, a krzywe kalibracyjne sporządzono z wyników dla nich uśrednionych (Ryc. 26 i 27).



**Ryc. 26.** Wykres zależności pola powierzchni pików TFV od jego stężenia w próbkach osocza,  $n = 3$ .



**Ryc. 27.** Wykres zależności pola powierzchni pików *Crn* od jej stężenia w próbkach osocza,  $n = 3$ .

Wartości współczynników korelacji dla obydwu krzywych kalibracyjnych są bliskie jedności i wynoszą odpowiednio 0,9999 dla TFV i 0,9998 dla *Crn*. Można więc stwierdzić, że uzyskane krzywe wykazują liniowy charakter w analizowanym zakresie stężeń. Wartości RSD oraz odzysków sugerują wysoką dokładność i precyzję opracowanej metody. Parametry walidacyjne zostały przedstawione w tabeli 11.

**Tabela 11.** Wyniki walidacji metody jednoczesnego oznaczania TFV i *Crn* w próbkach osocza,  $n = 3$  [142].

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
<b>TFV</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,5 – 5	$y=4,102-0,06$	0,9999	2,1	8,4	99,0	100,3
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ osocza]	0,001 – 0,04	$y=1086,7+24,19$	0,9998	0,3	4,9	93,6	107,4

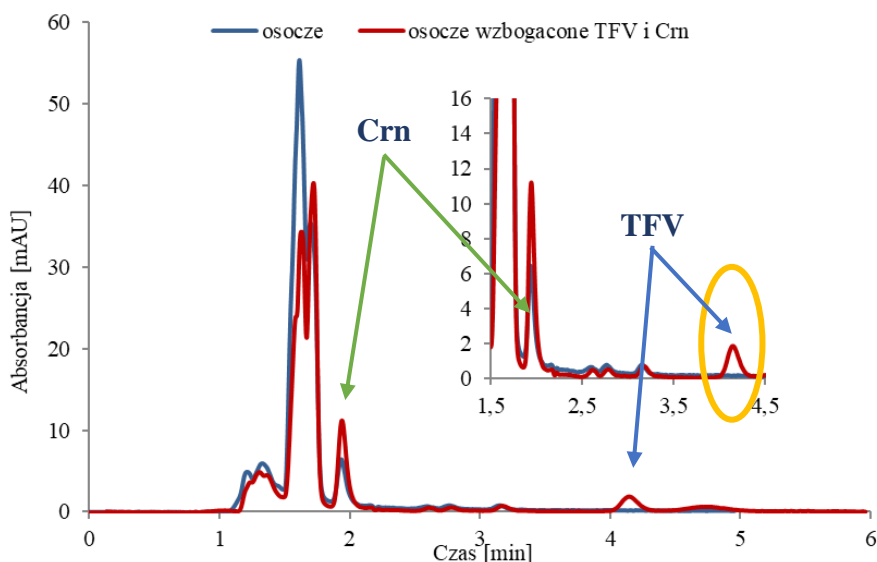
Zaprezentowany protokół walidacyjny obejmował również wyznaczenie wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej, które określono w analogiczny sposób, jak w przypadku próbek moczu, co opisano w podrozdziale 7.4. Każdą z próbek osocza o odpowiednim stężeniu analizowano w 3 seriach. W tabeli 12 zaprezentowano uzyskane rezultaty.

**Tabela 12.** Wyniki uzyskane dla badania precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej uzyskane dla próbek osocza wzbogaconego TFV, n = 3 [142].

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
<b>TFV</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,5	4,7	5,6	91,1	93,8
	2	4,1	3,6	91,5	93,5
	5	3,7	4,5	93,3	97,2
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ osocza]	0,001	1,9	4,0	91,3	102,8
	0,01	0,6	5,1	100,9	99,6
	0,04	0,5	1,4	100,7	99,3

Precyzja wewnątrz-dniowa i dokładność mieściły się odpowiednio w przedziałach 3,7-4,7% i 91,1-93,3% dla TFV oraz 0,5-1,9% i 91,3-100,9% dla Crn. Między-dniowa precyzja oraz dokładność w przypadku TFV wyniosły odpowiednio 3,6–5,6% i 93,5-97,2%, zaś dla Crn mieściły się w zakresach 1,4-5,1% oraz 99,3-102,8%.

Analogicznie jak w przypadku próbek moczu, opierając się na stosunku sygnału do szumu, eksperymentalnie wyznaczono wartości LOD i LOQ, które dla TFV wyniosły odpowiednio  $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$ , zaś dla Crn  $0,0003 \mu\text{mol ml}^{-1}$  i  $0,001 \mu\text{mol ml}^{-1}$ . Przykładowe chromatogramy próbek osocza przedstawiono na rycinie 28.



**Ryc. 28.** Chromatogramy próbki osocza przed i po wzbogaceniu standardem TFV o stężeniu  $25 \mu\text{g ml}^{-1}$  i Crn  $0,2 \mu\text{mol ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja izokratyczna: 2% MeCN i 98% PB ( $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4), temperatura kolumny  $25^\circ$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

Jak można zauważyć na zamieszczonym chromatogramie, stosując opisane warunki chromatograficzne uzyskuje się sygnały analityczne, które są symetryczne, dobrze wykształcone i rozdzielone od pozostałych pików pochodzących od składników matrycy. Czas retencji wynosił 1,9 minuty dla Crn i 4,1 minuty dla TFV. Niestety ze względów bezpieczeństwa opracowana metoda nie została wykorzystana do oznaczania zawartości TFV w rzeczywistych próbkach osocza pochodzących od osób zakażonych.

Zaproponowana szybka, selektywna metoda separacji wydaje się stanowić doskonale narzędzie do rutynowego oznaczania TFV i Crn w próbkach osocza. Brak konieczności stosowania dodatkowych, specjalistycznych etapów przygotowania próbki, zmniejszona ilość odpadów laboratoryjnych, takich jak próbówki/końcówki/fiolki polipropylenowe, minimalne zużycie niebezpiecznych, toksycznych rozpuszczalników, jak również krótki czas analizy przyczyniają się do konkurencyjności opracowanej metody.

## **9. OPRACOWANIE METODY OZNACZANIA TFV W ŚLINIE**

Ostatnie badania wskazują na coraz częstsze wykorzystanie śliny do oceny stanu zdrowia pacjentów. Monitorowanie stężenia preparatu terapeutycznego ma kluczowe znaczenie dla oceny skuteczności schematu leczenia i monitorowania zgodności terapii przeciwwirusowej. Wymaga jednak częstego pobierania krwi, co powoduje ból i często dyskomfort pacjentów. Natomiast pobieranie próbek śliny jest nieinwazyjne, tanie i proste. Nieinwazyjny charakter i prosty protokół pobierania próbek, pod warunkiem spełnienia określonych norm, pozwala na wykrycie w płynie jamy ustnej licznych związków. Ślina jako matryca posiadająca białka, traktowana jest jako materiał potencjalnie zakaźny, lecz sam proces pobrania płynu biologicznego do analizy stanowi dużą zaletę. Pacjent może pobrać materiał samodzielnie w domu znając ściśle określoną wcześniej procedurę, nawet jeżeli jest to dziecko.

W literaturze znaleźć można tylko jedną publikację dotyczącą oznaczania TFV w próbkach śliny [128], dlatego też w ramach niniejszej pracy doktorskiej opracowano prostą, szybką, selektywną i dokładną metodę oznaczania tego związku w ślinie z wykorzystaniem sprzętu analitycznego jakim jest HPLC-UV.

### **9.1. Warunki separacji chromatograficznej**

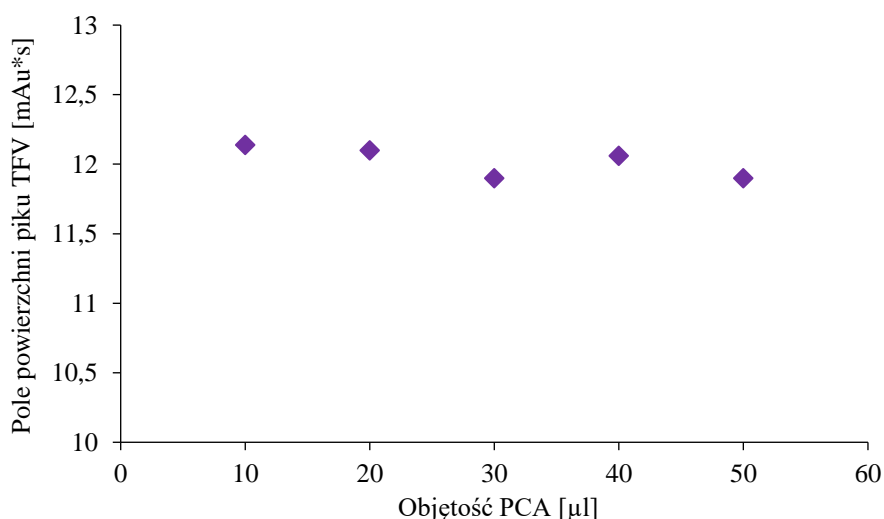
Przeprowadzone badania chromatograficzne, których celem było rozdzielenie i identyfikacja TFV prowadzone były z wykorzystaniem kolumny ZORBAX SB C18



(150 × 4,6 mm, 5 μm). Ta sama kolumna była wcześniej stosowana do jednoczesnego rozdzielania i oznaczenia TFV i Crn w próbkach moczu i osocza. Warunki rozdzielania chromatograficznego zostały zaadaptowane z opracowanej wcześniej procedury oznaczania TFV w osoczu. Jako składniki fazy ruchomej wykorzystano 0,015 mol l<sup>-1</sup> PB o pH 7,4 oraz MeCN. Niewielka zmiana stężenia MeCN w fazie ruchomej z 2% na 3% spowodowała otrzymanie bardziej symetrycznego piku TFV. Objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml min<sup>-1</sup>, temperatura termostatu kolumny ustawiona na 25°C, analityczna długość fali 260 nm, a czas analizy jedynie 5 min.

## 9.2. Przygotowanie próbki do analizy

Testy, które zostały przeprowadzone podczas realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej pozwoliły ograniczyć liczbę etapów przygotowania próbki do minimum. W tym przypadku, podobnie jak dla próbek osocza, przygotowanie śliny do analizy obejmowało jedynie etapy rozcieńczenia próbki PB będącym składnikiem fazy ruchomej oraz wytrącenie białek. Zbadano wpływ dodatku 3 mol l<sup>-1</sup> PCA na sygnał pochodzący od TFV. W tym celu do 100 μl śliny dodawano 20 μl roztworu TFV o stężeniu 4 μg ml<sup>-1</sup>, odpowiednio 10 μl, 20 μl, 30 μl, 40 μl, 50 μl PCA i próbkę uzupełniano PB (0,015 mol l<sup>-1</sup> i pH 7,4) do objętości końcowej 200 μl. Próbkę wirowano z prędkością 12000 obr min<sup>-1</sup> przez 10 min i w temp. 10°C. Do fiolek chromatograficznych pobierano 100 μl supernatantu, a 10 μl poddawano analizie chromatograficznej. Uzyskane wyniki przedstawiono na Ryc. 29.

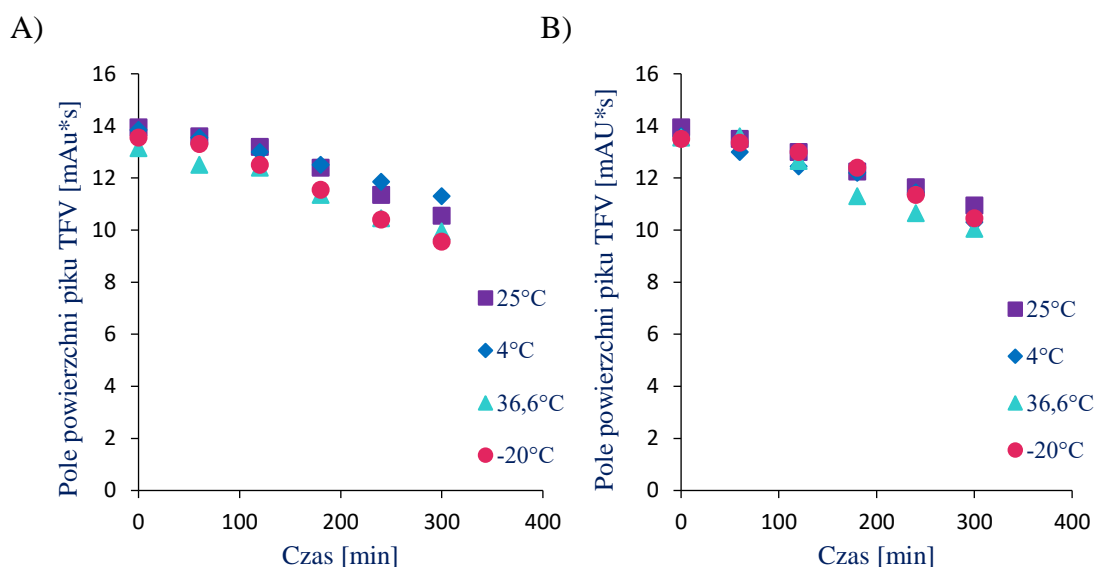


**Ryc. 29.** Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na zawartość TFV w próbkach śliny, n = 3.

Dodanie do 100  $\mu\text{l}$  śliny już 10  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA całkowicie wytrąciło białko obecne w próbce. Ze względu na znikome różnice w polu powierzchni pików TFV w próbkach z różnymi objętościami zastosowanego odczynnika strącającego do dalszych badań zdecydowano zastosować 10  $\mu\text{l}$  PCA o stężeniu 3  $\text{mol l}^{-1}$ . W trakcie prowadzenia analiz nie zaobserwowano wzrostu ciśnienia na kolumnie chromatograficznej oraz pogorszenia jakości otrzymywanych sygnałów. Niewielkie wahania czasu retencji sygnału TFV wynoszące ok. 0,1 minuty nie wpłynęły na proces separacji chromatograficznej.

### 9.3. Badanie trwałości TFV w ślinie

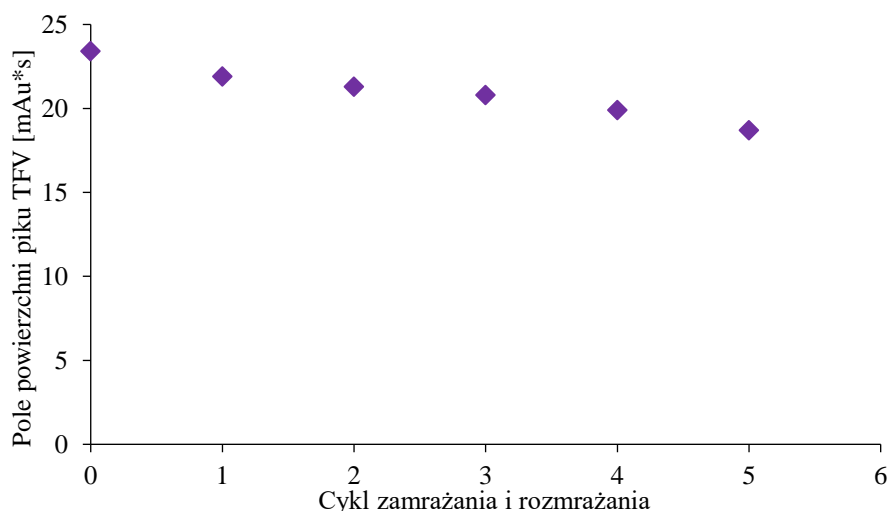
W toku badań sprawdzona została stabilność TFV we wzbogaconych próbkach śliny, jak również w uzyskanym po deproteinizacji supernatancie. Próbki śliny do badania uzyskano przez dodanie do 50  $\mu\text{l}$  śliny 10  $\mu\text{l}$  TFV o stężeniu 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Supernatanty do inkubacji otrzymano dodając do 50  $\mu\text{l}$  śliny 10  $\mu\text{l}$  TFV o stężeniu 4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz 5  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA i uzupełniając do końcowej objętości 100  $\mu\text{l}$  za pomocą PB (0,015  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 7,4), odwirowując z prędkością 12000 obr  $\text{min}^{-1}$  przez 10 min i w temp. 10°C. Wzbogacone TFV próbki śliny, jak i ich supernatanty inkubowano w temperaturach 36,6, 25, 4 i -20°C, przez 5 godzin, a testy przeprowadzano w interwałach 60 minutowych. Próbki śliny po inkubacji odbiałczano 5  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA i uzupełniano do końcowej objętości 100  $\mu\text{l}$  za pomocą PB (0,015  $\text{mol l}^{-1}$ , pH 7,4). Bezpośrednio przed analizą próbki odwirowywano (12000 obr  $\text{min}^{-1}$ , 10 min, 10°C). Pobierano 50  $\mu\text{l}$  supernatantu, a 10  $\mu\text{l}$  poddawano analizie HPLC. Otrzymane wyniki przedstawiono na rycinie 30.



**Ryc. 30.** Stabilność TFV w ślinie (A) i supernatancie śliny (B) przechowywanych w temperaturze 36,6, 25, 4 i -20°C przez okres 300 min,  $n = 3$ .

Przeprowadzone eksperymenty wskazały, że TFV w próbkach śliny przechowywanych w każdej z badanych temperatur ulega degradacji. W przypadku próbek śliny oraz supernatantu obserwujemy zmniejszające się stężenie TFV wraz z upływem czasu przechowywania próbek. Dla próbek przechowywanych w 4°C po upływie 60 min zawartość TFV zmniejsza się o 2,1 i 2,9% odpowiednio dla śliny i supernatantu, natomiast po 120 min o 6,1 i 8,5%, a po 180, 240 oraz 300 min odpowiednio o 9,7 i 10,3%, 11,8 i 15,8% oraz 18,4 i 19,8%. W przypadku temperatury pokojowej w czasie pierwszego pomiaru (po 60 min) spadek stężenia analitu oscyluje w obydwu przypadkach w okolicy 3%, a w kolejnych punktach czasowych 5,4 i 6,8%, 11,1 i 12,2%, 16,5% oraz 17,6 i 18,3%. Dla temperatury zbliżonej do temperatury ciała człowieka straty w pierwszym punkcie pomiarowym (60 min inkubacji) oscylują w granicach 4,5%, następnie 5,7 i 6,6% (120 min), w czasie 180 minut 13,4 i 16,5%, a dwa ostatnie punkty pomiarowe wahają się od 18,1-21,7%. Próbki przechowywane w temperaturze -20°C w czasie 60 minut osiągnęły straty analitu a poziomie 1,1-1,8%, po dwóch godzinach 4,7-6,7%, po 3 godzinach 8,1-10,4% po 4 godzinach nastąpiła degradacja na poziomie 16,9-19,8% i po pięciu godzinach eksperymentu zarówno dla próbek śliny jak i supernatantu śliny osiągnęła najwyższy ubytek stężenia spośród badanych temperatur i wynosił ok. 23% wartości początkowej.

Przeprowadzono również test cyklicznego zamrażania (-20°C) i rozmrażania (4°C) próbki śliny. Próbki do eksperymentu przygotowano analogicznie jak w przypadku badania trwałości, ale dla wyjściowej objętości 200  $\mu\text{l}$  śliny i wzbogacano je roztworem TFV o stężeniu 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Otrzymane próbki zamrażano i rozmrażano w 5 cyklach. Na Ryc. 31 zaprezentowano zawartość TFV wyrażoną powierzchnią piku w zależności od ilości cykli zamrażania i rozmrażania.

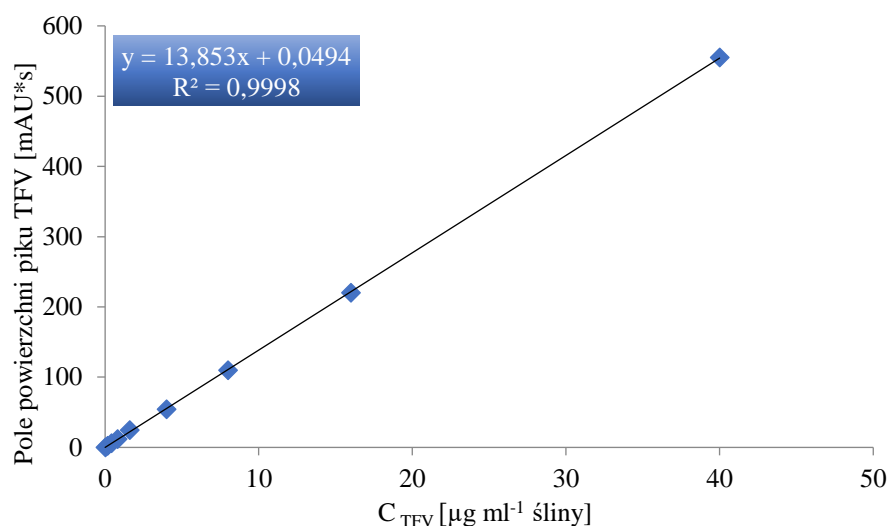


**Ryc. 31.** *Stabilność TFV w próbce śliny po kilkukrotnym zamrażaniu i rozmrożeniu odpowiednio w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$  i  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 3$ .*

Otrzymane wyniki wskazują, iż wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbek wpływa na degradację badanego związku. Pierwsze rozmrożenie próbki spowodowało spadek poziomu TFV o 6,2%, zaś kolejnym cyklu już o 8,9%. 5-cykliczny test skutkowałam spadkiem poziomu TFV o 20,3%. Obserwacje zdecydowanie wskazują, że próbki śliny należy poddawać analizie po jednym, maksymalnie po dwóch cyklach zamrażania i rozmrażania. W przypadku, gdy jest to niemożliwe, należy liczyć się z degradacją badanego związku na poziomie ok. 20% po pięciu cyklach zamrażania i rozmrażania prób.

#### **9.4. Walidacja i wykorzystanie metody**

Podobnie jak podczas eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem moczu i osocza, również w przypadku badań z próbkami śliny konieczne było przygotowanie krzywej kalibracyjnej. W tym celu do probówek zawierających po 100  $\mu\text{l}$  śliny dodawano 20  $\mu\text{l}$  TFV o wzrastającym stężeniu 0,75, 2, 4, 8, 20, 40, 80, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , 10  $\mu\text{l}$  PCA ( $3 \text{ mol l}^{-1}$ ) i uzupełniano do końcowej objętości 200  $\mu\text{l}$  roztworem PB ( $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4). Następnie próbki odwirowywano przez 10 min w temp.  $10^{\circ}\text{C}$  i prędkości 12000 obr  $\text{min}^{-1}$ , pobierano 100  $\mu\text{l}$  supernatantu, a 10  $\mu\text{l}$  wprowadzano do kolumny chromatograficznej. Na rycinie 32 zaprezentowano krzywą kalibracyjną próbek śliny, otrzymaną z uśrednionych wartości dla trzech serii pomiarowych. Wartość współczynnika korelacji jest bliska jedności, a krzywa wykazuje liniowy charakter w analizowanym przedziale stężeń. Wybrane wyniki procedury walidacyjnej dla metody oznaczania TFV zaprezentowano w tabeli 13.



Ryc. 32. Krzywa kalibracyjna uzyskana dla próbek śliny wzbogaconych TFV,  $n = 3$ .

Tabela 13. Wyniki walidacji metody oznaczania TFV w próbkach śliny,  $n = 3$ .

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
TFV [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,15	4,6	7,2	105,8	107,1
	1,6	3,1	2,5	104,5	104,6
	40	1,1	1,5	99,2	100,8

Podczas procesu walidacji metody określono także takie parametry jak dokładność i precyzja wewnątrz- i między-dniowa, których wyniki zestawiono w tabeli 14. Parametry te, podobnie jak dla poprzednich metod wyznaczono w analogiczny sposób opisany w podrozdziale 7.4.

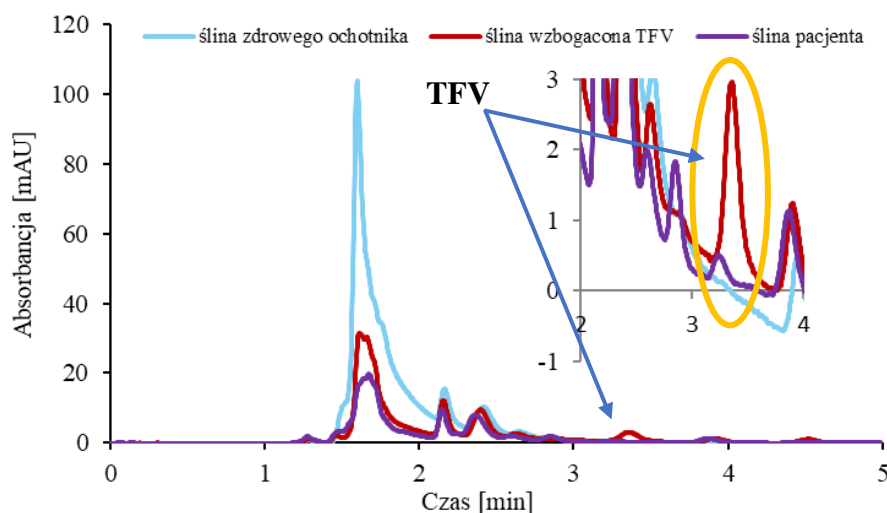
Tabela 14. Precyzja i dokładność metody oznaczania TFV w ślinie,  $n = 3$ .

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
TFV [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,15 – 40	$y=13,85+0,049$	0,999	0,97	11,4	98,0	110,2

Wartości precyzji i dokładności wewnątrz-dniowej mieściły się odpowiednio w zakresach od 1,1-4,6% i 99,2-105,8%, zaś dla precyzji i dokładności między-dniowej odpowiednio w przedziale 1,5-7,2% oraz 100,8-107,1%.

Wartości LOD i LOQ wyznaczono eksperymentalnie poprzez dodanie do próbek śliny malejących stężeń TFV i wyznaczeniu stosunku sygnału do szumu. Uzyskane granice wykrywalności i oznaczalności wynoszą odpowiednio 0,01 i 0,015  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Zastosowanie techniki HPLC umożliwiło opracowanie dokładnej i powtarzanej metody oznaczania TFV w próbkach śliny człowieka. Procedura przygotowania próbki wykorzystuje jedynie jej rozcieńczenie oraz deprotenizację. Zastosowanie opracowanej metody umożliwiło oznaczenie TFV w czasie nie przekraczającym 5 min w próbce śliny pacjentki w wieku 33 lata poddanej terapii środkiem Viread w dawce 123 mg. Próbkę do analizy zostały pobrane przed spożyciem posiłku zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 6. Próbkę analizowano w trzech powtórzeniach. Wyliczona zawartość TFV wyniosła 0,24  $\mu\text{g ml}^{-1}$  śliny. Chromatogramy uzyskane w trakcie badań przedstawiono poniżej (Ryc. 33).



**Ryc. 33.** Chromatogramy otrzymane dla próbek: śliny pochodzącej od osoby zdrowej, śliny wzbogaconej TFV o stężeniu 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz śliny pacjentki przyjmującej TFV w postaci leku Viread w dawce 123 mg. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja izokratyczna: 3% MeCN i 97% PB ( $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,4), temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1 \text{ ml min}^{-1}$ .

## 10. OZNACZANIE ENT Z WYKORZYSTANIEM DETEKCJI SPEKTROFOTOMETRYCZNEJ

Ostatnimi czasy obserwuje się duże zainteresowanie udoskonalaniem metod analitycznych umożliwiających precyzyjną i kompleksową analizę indywidualnych chemicznych występujących w wybranych matrycach biologicznych. Postępowa analiza

chemiczna dąży do oznaczania wybranych związków chemicznych na coraz niższych poziomach stężeń oraz w jak najkrótszym czasie.

W związku z niewielką ilością opublikowanych prac dotyczących oznaczania ENT w próbkach biologicznych, kolejny z etapów prowadzonych badań w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczył opracowania chromatograficznych metod oznaczania ENT. W przypadku wybranego leku metodologie przedstawione w literaturze koncentrują się głównie na problemie oznaczania zawartości ENT w tabletkach, a także wzbogaconym osoczu.

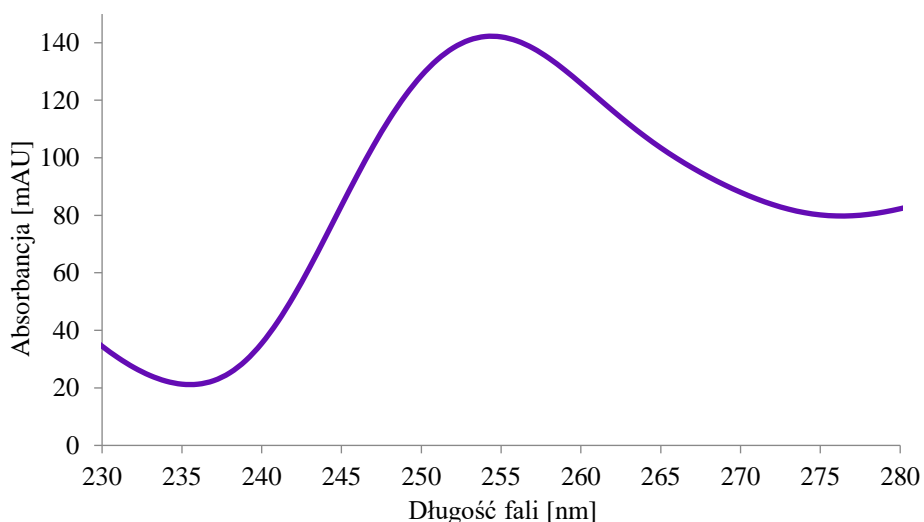
W eksperymentach wykorzystano technikę RP-HPLC z detekcją UV i FLD. Szerokie możliwości zastosowania techniki HPLC, jak również jej olbrzymia popularność wśród analityków, biochemików i klinicystów, sprawiają, że opracowane z jej udziałem metodyki łatwo znajdują zastosowanie w praktyce, a co za tym idzie stwarzają szerokie możliwości aplikacyjne szczególnie w rutynowych analizach. Obecny rozdział przedstawia przeprowadzone przeze mnie badania mające na celu opracowanie metodyk oznaczania ENT w moczu, osoczu i ślinie w oparciu o technikę HPLC z detekcją UV.

### **10.1. Optymalizacja procedury jednoczesnego oznaczania ENT i Crn w próbkach moczu**

W pierwszym etapie prowadzonych badań, podobnie jak w przypadku oznaczania TFV, skoncentrowano się na doborze optymalnych warunków pracy układu chromatograficznego. Wybrano odpowiednią kolumnę chromatograficzną, dobrano optymalny rodzaj i skład fazy ruchomej, a także prędkość jej przepływu, dokonano wyboru analitycznej długości fali detekcji, dostarczając skuteczne narzędzie do jakościowej i ilościowej charakterystyki wybranych związków, tj. Crn i ENT.

#### ***Wybór analitycznej długości fali***

Pierwszym etapem badań związanych z opracowaniem procedury jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w moczu był dobór optymalnej długości fali detekcji dla ENT, ponieważ wartość ta dla Crn została wyznaczona wcześniej (Ryc. 8). W tym celu przeanalizowano widma UV w zakresie obejmującym występowanie maksimum absorpcji ENT, mieszczącym się w przedziale od 230 do 280 nm. Optymalna wartości analitycznej długości fali wyniosła 254 nm (Ryc. 34).



**Ryc. 34.** Widmo ENT zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej.

### ***Optimalizacja warunków separacji chromatograficznej ETN i Crn***

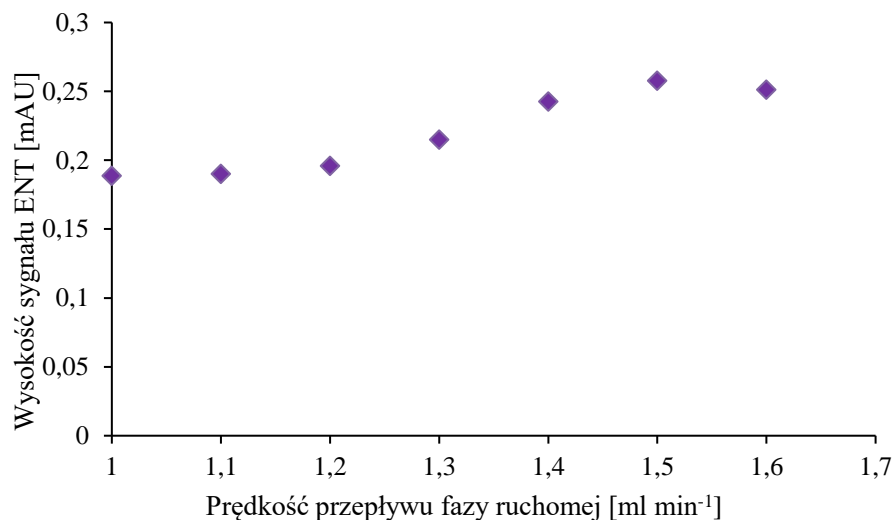
Drugim etapem optymalizacji procedury był wybór odpowiedniej kolumny chromatograficznej. Podczas procesu optymalizacji metody zbadano kilka różnych kolumn analitycznych, w tym: Zorbax SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm), Kinetex HILIC (100×4,6 mm, 2,6 μm), Poroshell (75×4,6 mm, 2,7 μm) oraz LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 μm).

Głównym problemem w trakcie doboru odpowiedniej kolumny chromatograficznej był brak możliwości odseparowania sygnału analitycznego ENT od pozostałych pików pochodzącymi od matrycy. Zastosowanie różnych kombinacji faz ruchomych z różnymi modyfikatorami organicznymi oraz rodzajami elucji nie pomogły w rozwiązaniu tego problemu. Punktem przełomowym w trakcie badań było zastosowanie kolumny LiChrosorb RP-18, która była najdłuższą z wykorzystanych kolumn (250 mm). Umożliwiła ona rozdzielenie ENT od pozostałych składników moczu. Dla potwierdzenia czystości rozdzielonego sygnału ENT, porównano widma UV zarejestrowane dla próbki moczu wzbogaconego lekiem z widmami zebranymi dla standardu ENT i korzystając z możliwości jakie daje oprogramowanie potwierdzono czystość pikę ENT.

Po wybraniu odpowiedniej kolumny chromatograficznej przeprowadzono proces optymalizacji warunków rozdzielania wybranych związków. Zbadano wpływ modyfikatorów organicznych takich jak MeOH oraz MeCN oraz objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej na jakość rejestrowanego sygnału analitu. Wpływ objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej badano w zakresie 1,0 – 1,6 ml min<sup>-1</sup>.



Jako fazę ruchomą wykorzystywano MeCN oraz PB o stężeniu  $0,005 \text{ mol l}^{-1}$  pH równym 7 zmieszane w stosunku objętościowym 1:9. Elucję prowadzono w trybie izokratycznym, a temperatura kolumny wynosiła  $25^\circ\text{C}$ . Każdorazowo do układu chromatograficznego wprowadzano po  $10 \mu\text{l}$  roztworu standardu ENT o stężeniu  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Badaną zależność przedstawiono na poniższym wykresie (Ryc. 35).



**Ryc. 35.** Wykres zależności wysokości piku ENT od objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej dla kolumny LiChrosorb RP-18,  $n = 3$ .

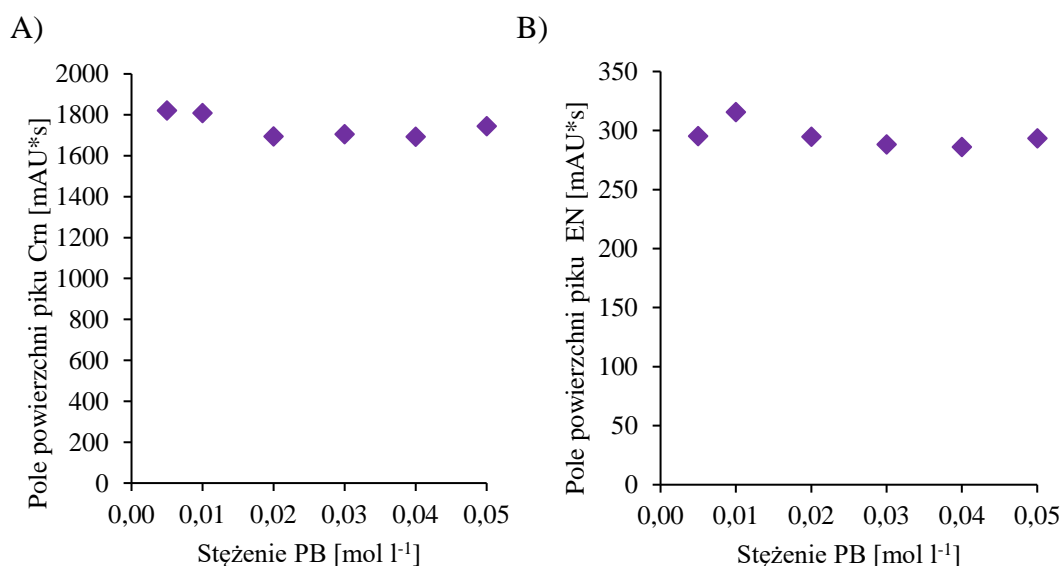
Najlepiej wykształcony sygnał dla ENT uzyskano przy zastosowaniu objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej równej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ , którą wykorzystywano w dalszych etapach badania. W kolejnym kroku eksperymentalnym, chcąc uzyskać jak najbardziej symetryczne i ostre piki analitów przebadano szereg profili gradientowy z zastosowaniem MeCN jako modyfikatora organicznego.

Na tym etapie badań najlepszą separację chromatograficzną z dobrze wykształconymi sygnałami ENT i Crn oraz powtarzalnymi czasami retencji uzyskano przy użyciu kolumny LiChrosorb RP-18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $10 \mu\text{m}$ ), wykorzystując PB o stężeniu  $0,005 \text{ mol l}^{-1}$  pH równym 7 oraz MeCN jako modyfikator organiczny. W badaniach zastosowano gradientowy tryb elucji (0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN) i objętościową prędkością przepływu fazy ruchomej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Założenia pracy bazujące na ograniczeniu zużycia rozpuszczalników organicznych jak i minimalizowaniu ilości odpadów toksycznych spowodowały, iż podobnie jak w przypadku próbek TFV, zdecydowano się na użycie niskiego stężenia

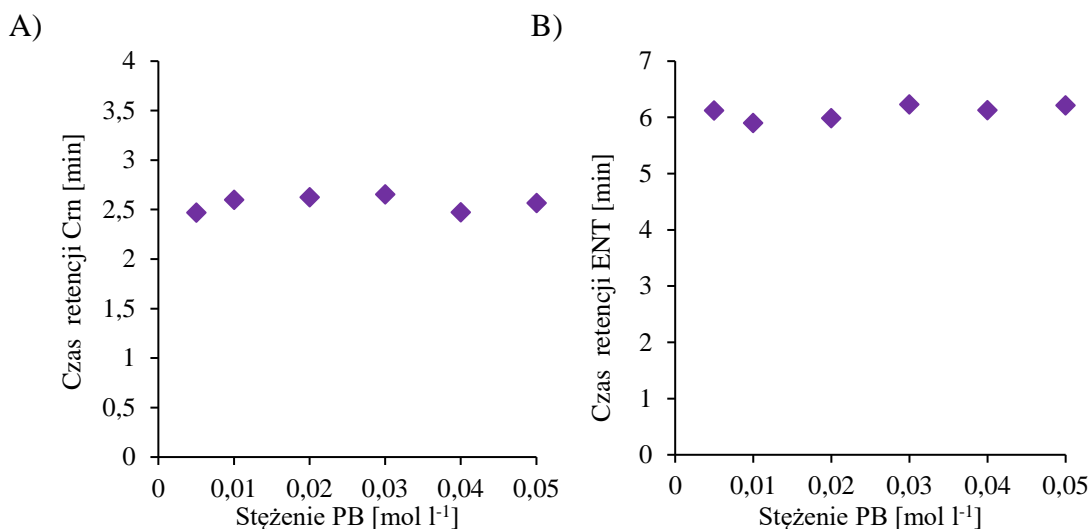
buforu fosforanowego (PB) i jak najmniejszej zawartości MeCN w fazie ruchomej. W celu optymalizacji stężenia wodnego składnika fazy ruchomej, przygotowano serię roztworów PB o stężeniach 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05 mol l<sup>-1</sup> i pH równym 7. Wszystkie analizy przeprowadzono w temperaturze 25°C przy objętościowej prędkości fazy ruchomej równym 1,5 ml min<sup>-1</sup>. Próbki przygotowano poprzez rozcieńczenie 50 µl moczu za pomocą 140 µl buforu będącego składnikiem fazy ruchomej i wzbogacenie 20 µl ENT i 5 µl Crn odpowiednio o stężeniach 250 µg ml<sup>-1</sup> i 50 µmol ml<sup>-1</sup>.

Jako kryterium decydujące o jakości rozdzielania pików Crn i ENT przyjęto parametr ilościowy, jakim jest pole powierzchni oraz jakościowy - wartości czasów retencji pików. Na podstawie otrzymanych wyników separacji chromatograficznej wykreślono zależności wyżej wymienionych parametrów od stężenia PB w fazie ruchomej, które przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc. 36).



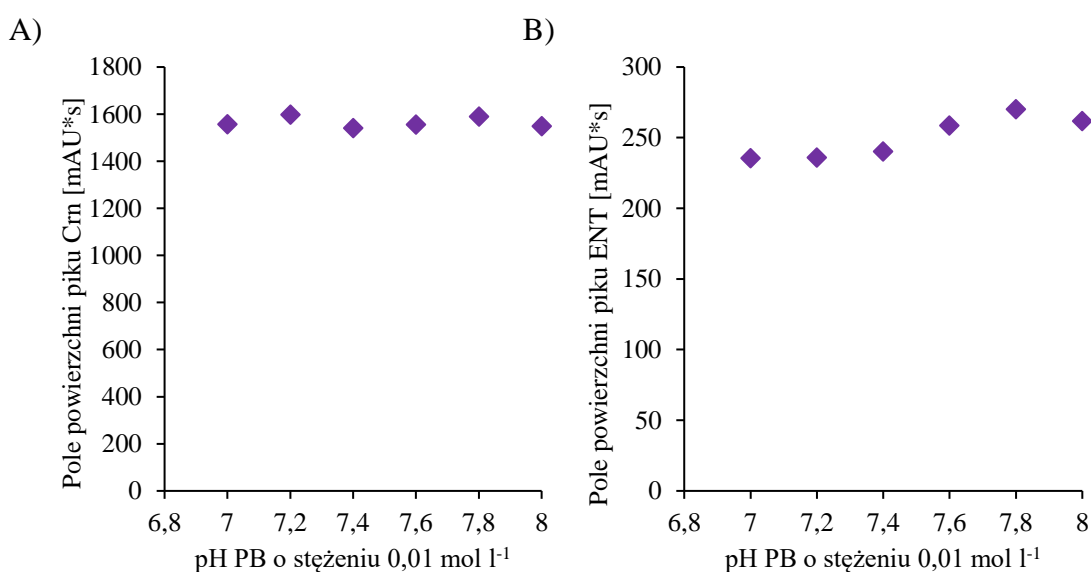
**Ryc. 36.** Wykresy zależności wpływu stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzącego od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

Na podstawie otrzymanych zależności (Ryc. 36) pól powierzchni pików Crn i ENT od stężenia buforu fosforanowego w fazie ruchomej stwierdzono, że jego stężenie w badanym zakresie od 0,005 do 0,05 mol l<sup>-1</sup> nie wpływa znacząco na zmianę pola powierzchni sygnału Crn. W przypadku ENT największy sygnał uzyskano przy zastosowaniu PB o stężeniu 0,01 mol l<sup>-1</sup>. Zaobserwowano, że zmiana stężenia buforu w fazie ruchomej nie ma znaczącego wpływu na czas retencji ENT i Crn (Ryc. 37). Otrzymane zależności pozwoliły na stwierdzenie, że optymalne stężenie PB w fazie ruchomej to 0,01 mol l<sup>-1</sup>.



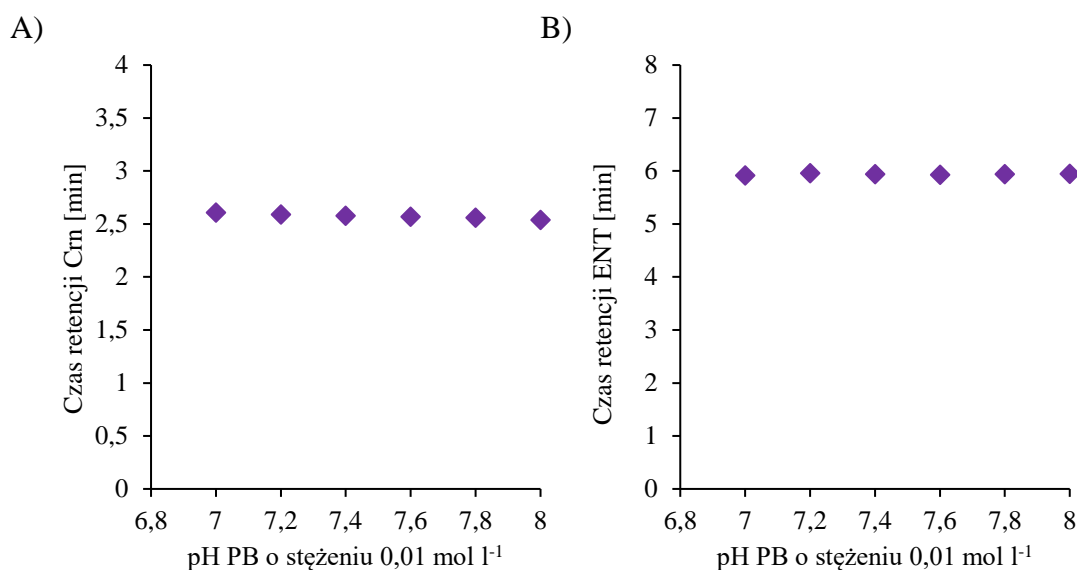
**Ryc. 37.** Wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

W trakcie optymalizacji parametrów rozdzielania wybranych analitów zbadano wpływ pH PB na pola powierzchni i czasy retencji pików. W tym celu przygotowano serię roztworów PB o stężeniu 0,01 mol l<sup>-1</sup> ze zmiennymi wartościami pH w zakresie od 7 do 8, z zachowaniem zmian co dwie dziesiąte jednostki. W eksperymentach zastosowano prędkość przepływu fazy ruchomej równą 1,5 ml min<sup>-1</sup>, temperaturę kolumny 25°C. Elucję prowadzono w trybie gradientowym opisanym powyżej, a faza ruchoma składała się MeCN i 0,01 mol l<sup>-1</sup> PB o zmiennym pH. Próbki przygotowano w analogiczny sposób jak podczas badania optymalnego stężenia PB. Uzyskane wyniki przedstawiono na poniższych wykresach (Ryc. 38 i 39).



**Ryc. 38.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

W toku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż pH zastosowanej fazy ruchomej wpływa na wielkość pola powierzchni sygnału analitycznego pochodzącego od ENT. Największe piki uzyskano dla zakresu pH 7,6 – 8. Stosowanie fazy ruchomej o pH poniżej 7,6 skutkowało niewielkim spadkiem wielkości pola powierzchni piku. W przypadku Crn wartość pH nie wpływała na wielkość otrzymywanego sygnału. Zmiany pH PB nie powodowały zmian w czasach retencji pików Crn i ENT, a minimalne jego wahania nie wpłynęły na jakość identyfikacji obydwu pików.



**Ryc. 39.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czas retencji pików Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

Przeprowadzone eksperymenty optymalizacji warunków separacji chromatograficznej ETN i Crn wskazały, że najlepszą jakość rozdzielania poszczególnych analitów od pozostałych składników matrycy można uzyskać stosując jako składnik nieorganiczny fazy ruchomej PB o stężeniu 0,01 mol l<sup>-1</sup> i pH 7,8 oraz wykorzystując elucję gradientową o następującym profilu 0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN. Dzięki zastosowaniu gradientu długości fali możliwa była optymalna detekcja obu składników próbki w jednym toku analizy. Gradient długości fali przedstawiał się następująco: 0-3 min 234 nm i 3-10 min 254 nm.

#### **Przygotowanie próbki moczu do analizy**

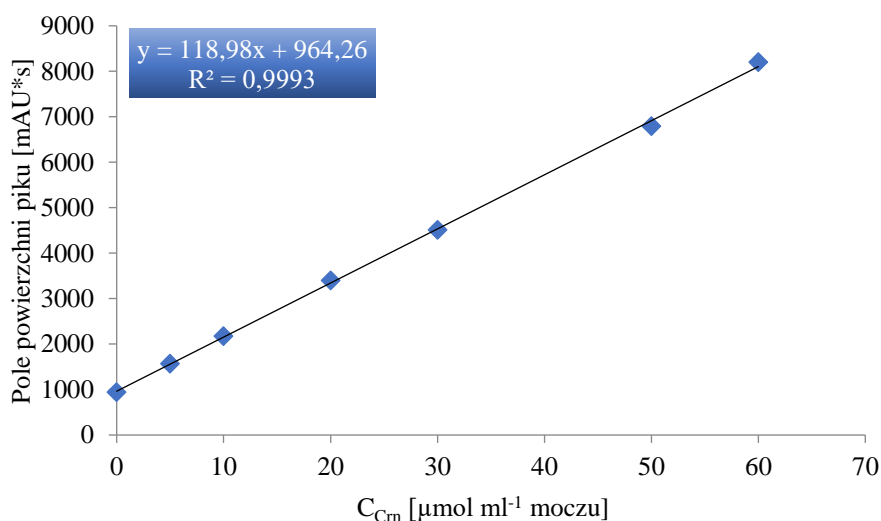
Jednym z najbardziej istotnych elementów w trakcie każdej analizy jest etap przygotowania próbki. Podczas separacji i identyfikacji składników w próbkach biologicznych, największym wyzwaniem jest uproszczenie matrycy umożliwiającej

wykrycie i oznaczenie wybranego analitu. Zazwyczaj etap ten sprawia wiele trudności i jest bardzo czasochłonnym procesem.

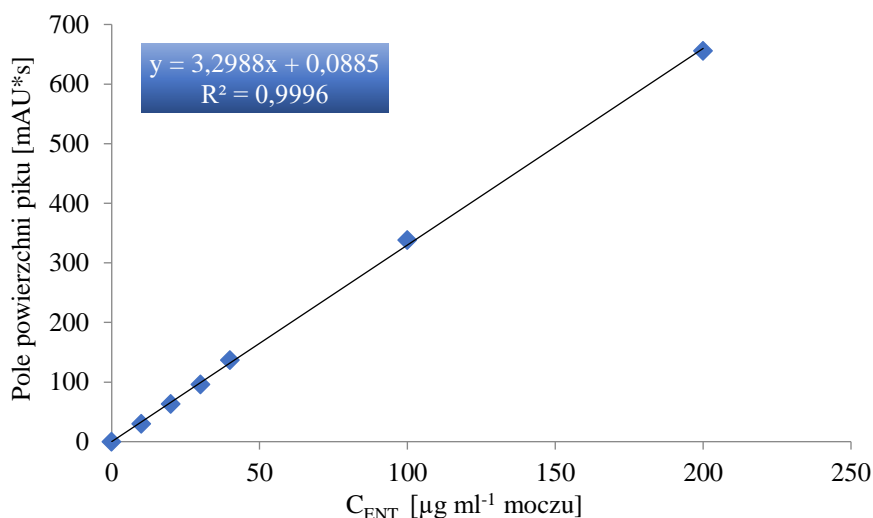
Zgodnie z założeniami niniejszej pracy prowadzone analizy miały cechować się zminimalizowaniem zużycia odczynników i materiałów laboratoryjnych, uproszczeniem procedur przygotowania próbek, jak również zredukowaniem czasu analizy. W opracowanej metodzie etap przygotowania próbki do analizy ograniczał się jedynie do czterokrotnego rozcieńczenia próbki moczu wodnym składnikiem fazy ruchomej, tj. PB o stężeniu  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,8. Powyższy sposób przygotowania próbki umożliwił maksymalne uproszczenie tego etapu oraz uzyskanie rzetelnych wyników separacji i identyfikacji wybranych związków.

#### **Walidacja metody jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w moczu**

Po zoptymalizowaniu warunków rozdzielania dokonano walidacji metody. W celu sporządzenia krzywych kalibracyjnych, poddano analizie próbki moczu sporządzone w trzech seriach pomiarowych, a uśrednione wartości stanowiły podstawę do ich wykreślenia. Próbki do analizy przygotowano poprzez dodanie do  $50 \mu\text{l}$  moczu  $20 \mu\text{l}$  ENT o stężeniach 25, 50, 75, 100, 250,  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ ,  $5 \mu\text{l}$  Crn (50, 100, 200, 300, 500,  $600 \mu\text{mol ml}^{-1}$ ) i uzupełnienie do końcowej objętości  $200 \mu\text{l}$  PB o stężeniu  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,8. Każdą próbkę w objętości  $10 \mu\text{l}$  wprowadzano do układu chromatograficznego, a zależności pola powierzchni pików Crn i ENT od zadanego stężenia zestawiono na wykresach poniżej (Ryc. 40 i 41).



**Ryc. 40.** Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia Crn w próbce moczu,  $n = 3$ .



**Ryc. 41.** Krzywa kalibracyjna dla ENT sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w próbce moczu,  $n = 3$ .

Wartości współczynników korelacji dla każdej z krzywych są bliskie jedności (tabela 15), co świadczy o prawidłowym doborze zakresu liniowości metody. Wartości RSD oraz odzysków potwierdzają wysoką dokładność i precyzję opracowanej metody.

**Tabela 15.** Wyniki walidacji metody oznaczania Crn i ENT w próbkach moczu,  $n = 3$ .

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
<b>ENT</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ mocz]	10 – 200	$y = 3,299 + 0,088x$	0,9998	0,9	4,5	91,2	103,6
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ mocz]	5 – 60	$y = 118,98 + 964,26x$	0,9996	0,1	6,9	98,3	106,1

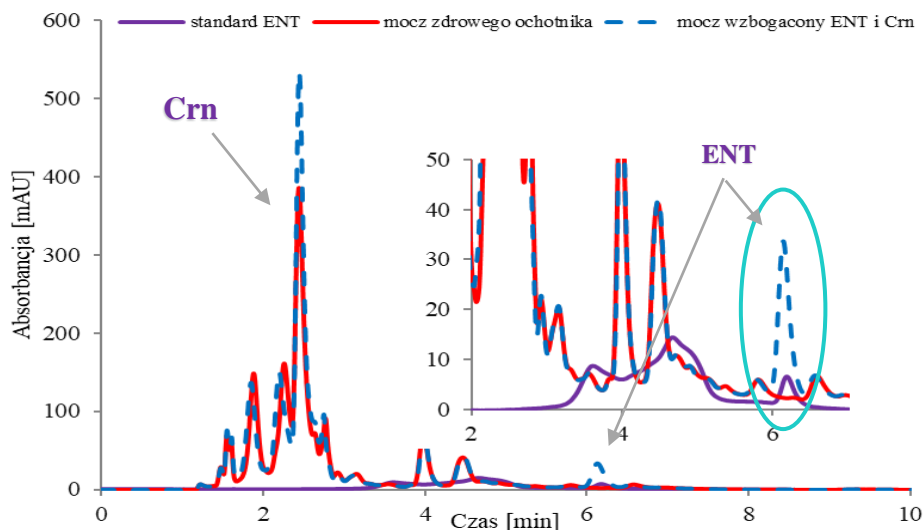
Wyznaczono również precyzję i dokładność metody. Wewnątrz-dniowe wartości precyzji i dokładności wyznaczono na podstawie pomiarów wykonanych tego samego dnia w trzech powtórzeniach w próbkach moczu wzbogaconych wzorcami. Zbadano trzy stężenia w całym zakresie krzywych kalibracyjnych: jedno w pobliżu granicy oznaczalności, następne w pobliżu środka i trzecie w pobliżu górnego końca krzywych kalibracyjnych. Między-dniowe wartości precyzji i dokładności oceniano w trzech kolejnych dniach w ciągu jednego tygodnia. Próbkę o odpowiednich stężeniach analizowano w trzech powtórzeniach. Obliczone wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej opracowanej metody uzyskane dla wybranych stężeń krzywej kalibracyjnej przedstawiono w tabeli 16.

**Tabela 16.** Precyzja i dokładność wewnątrz- i między-dniowa metody oznaczania Crn i ENT w moczu, n=3.

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
<b>ENT</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ moczu]	10	1,3	7,1	96,2	95,2
	30	2,5	4,8	103,6	97,3
	200	2,3	4,5	99,4	102,1
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ moczu]	5	3,4	7,7	106,1	106,8
	30	2,8	5,2	100,4	102,2
	60	0,9	4,6	101,7	101,3

Precyzja wewnątrz-dniowa i dokładność dla badanych analitów mieściły się odpowiednio w przedziałach 1,3-2,5% i 96,2-103,6% dla ENT oraz 0,9-3,4% i 100,4-106,1% dla Crn. Między-dniowa precyzja oraz dokładność w przypadku ENT wyniosły odpowiednio 4,5-7,1% i 95,2-102,1%, zaś dla Crn mieściły się w zakresach 4,6-7,7% oraz 101,3-106,8%. Otrzymane wartości odpowiadają wymaganiom walidacyjnym stawianym próbkom biologicznym [145].

Wartości LOD i LOQ wyznaczono eksperymentalnie poprzez dodanie do próbek moczu malejących stężeń ENT i wyznaczeniu stosunku sygnału do szumu przyjmując kryteria 3/1 S/N dla LOD i 10/1 S/N dla LOQ. W przypadku Crn, wartości te wyznaczono używając roztworu soli fizjologicznej zamiast moczu. Granice wykrywalności i oznaczalności dla ENT wyniosły  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $2,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , zaś dla Crn  $0,008 \mu\text{mol ml}^{-1}$  i  $0,05 \mu\text{mol ml}^{-1}$ . Otrzymany chromatogram przedstawiono na rycinie poniżej (Ryc. 42).



**Ryc. 42.** Chromatogramy otrzymane dla standardu ENT, próbki moczu zdrowego ochotnika oraz moczu wzbogaconego Crn i ENT odpowiednio o stężeniach  $200 \mu\text{mol ml}^{-1}$  i  $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $10 \mu\text{m}$ ), elucja gradientowa: 0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN, PB ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,8), temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Proponowane warunki umożliwiły identyfikację i precyzyjną integrację pików. Dla Crn czas retencji wynosił 2,3 minuty, zaś dla ENT 6,1 minuty. Jak można zauważyć na zamieszczonym chromatogramie, zoptymalizowana metoda pozwala uzyskać wąski, symetryczny, dobrze wykształcony i odseparowany pik ENT.

Zaproponowana szybka, selektywna metoda separacji wydaje się stanowić doskonale narzędzie do rutynowego oznaczania wybranych związków w moczu. Ze względu na brak danych literaturowych związanych z oznaczaniem ENT w wybranej matrycy biologicznej można stwierdzić, iż jest to pierwsza chromatograficzna metoda separacji i identyfikacji ENT w próbkach moczu człowieka. Brak konieczności stosowania skomplikowanej aparatury, prostota przygotowania próbki do analizy, minimalne zużycie toksycznych rozpuszczalników, a także krótki czas analizy stanowią dodatkowe plusy zoptymalizowanej metody.



## **10.2. Opracowanie metody jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w osoczu krwi człowieka**

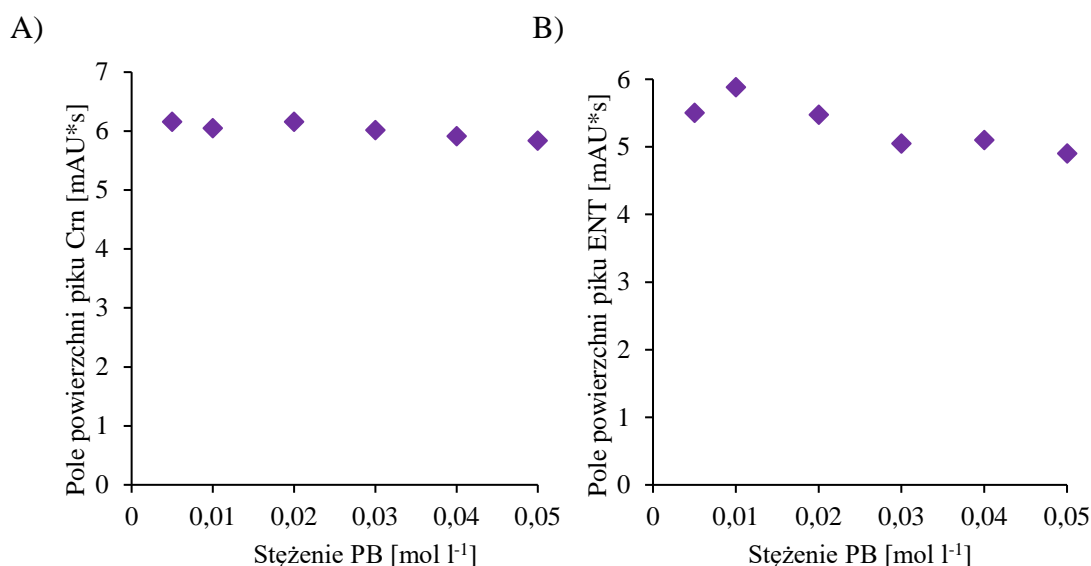
Protokoły dotyczące sposobu oznaczania ENT w osoczu krwi stanowią większość opisanych w literaturze metod oznaczania tego związku w próbkach biologicznych. Żadna z dotychczas opracowanych metod nie umożliwia jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza krwi. Możliwość kontrolowania zadanej dawki leku jak i stanu czynności nerek u leczonych pacjentów dodatkowo staje się dużym atutem zaproponowanej metody.

Poniżej opisano procedurę rozwijania nowej chromatograficznej metody jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza krwi. W badaniach wykorzystano technikę HPLC sprzężoną z detekcją UV.

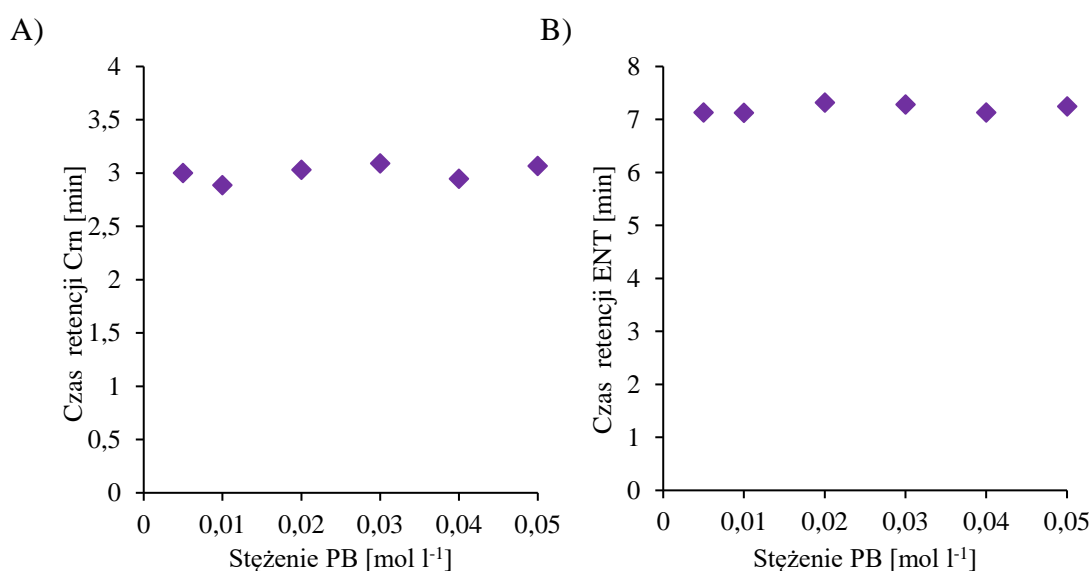
### ***Dobór warunków rozdzielania chromatograficznego***

Wszystkie badania chromatograficzne prowadzone były z wykorzystaniem kolumny LiChrosorb RP-18, wybranej podczas optymalizacji warunków oznaczania analitów w próbkach moczu. Optymalizację parametrów chromatograficznych przeprowadzono na próbkach osocza wzbogaconych analitem przy zastosowaniu optymalnych warunków chromatograficznych uzyskanych dla moczu (elucja gradientowa: 0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN, PB, temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,5 ml min<sup>-1</sup>). Ponowne przeprowadzenie badań było podyktowane zmianą matrycy z moczu na osocze, w którym będą oznaczane ENT i Crn.

Proces optymalizacji warunków rozdzielania obejmował zbadanie wpływu stężenia PB i jego pH na wielkości pól powierzchni pików i czasy retencji wybranych analitów. W tym celu do 50 µl osocza dodawano 20 µl ENT o stężeniu 7,5 µg ml<sup>-1</sup>, 30 µl PCA o stężeniu 3 mol l<sup>-1</sup> i uzupełniano do końcowej objętości 500 µl buforem będącym składnikiem fazy ruchomej. Próbkę odwirowywano w temperaturze 4°C przez 10 minut stosując prędkość wirowania 12000 obr min<sup>-1</sup>. Do fiolek chromatograficznych wprowadzono 100 µl supernatantu, a 10 µl poddawano analizie chromatograficznej, Podobnie jak w przypadku próbek moczu, stężenie PB badano w zakresie od 0,005 do 0,05 mol l<sup>-1</sup>. Na podstawie uzyskanych uśrednionych wyników wykreślono poniższe zależności (Ryc. 43 i 44).



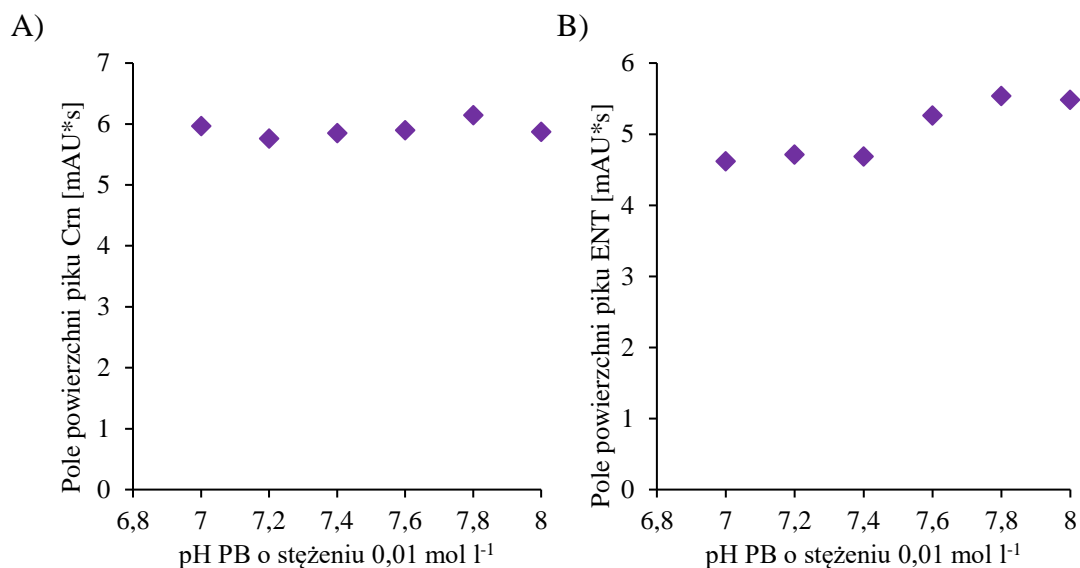
**Ryc. 43.** Wykresy zależności wpływu stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .



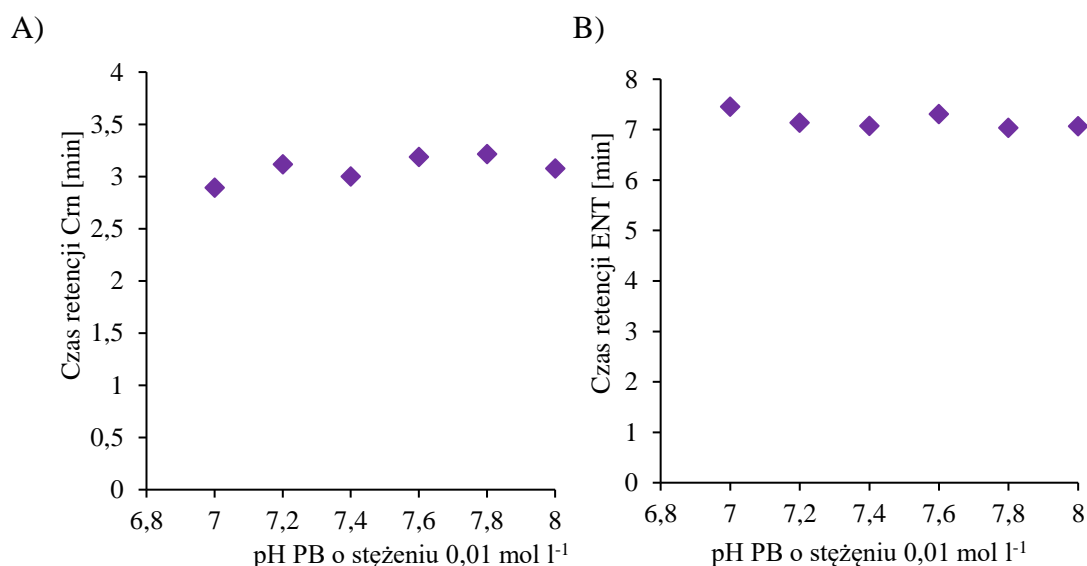
**Ryc. 44.** Wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

Analizując powyższe wykresy stwierdzono, że stężenie buforu w badanym zakresie od 0,005 do 0,05 mol l<sup>-1</sup> nie wpływa znacząco na zmianę pola powierzchni pików Crn. W przypadku ENT można zaobserwować tendencję spadkową wraz ze wzrostem stężenia PB w fazie ruchomej w przedziale od 0,01 do 0,05 mol l<sup>-1</sup>, dlatego też, podobnie jak w przypadku próbek moczu, do dalszych badań wybrano stężenie 0,01 mol l<sup>-1</sup>. W zakresie od 0,005 do 0,05 mol l<sup>-1</sup> stężenie PB nie wpływało znacząco na czasy retencji pików.

W kolejnym kroku zbadano wpływ wartości pH buforu na powierzchnię sygnałów oraz czas retencji analitów. Badania zmiany pH stosowanego PB w zakresie od 7 do 8 wykonane były z wykorzystaniem następujących warunków chromatograficznych: elucja gradientowa: 0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN, PB o stężeniu  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^{\circ}\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ . Próbkę osocza przygotowano w analogiczny sposób jak podczas badania optymalnego stężenia PB (Ryc. 45, 46).



**Ryc. 45.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .



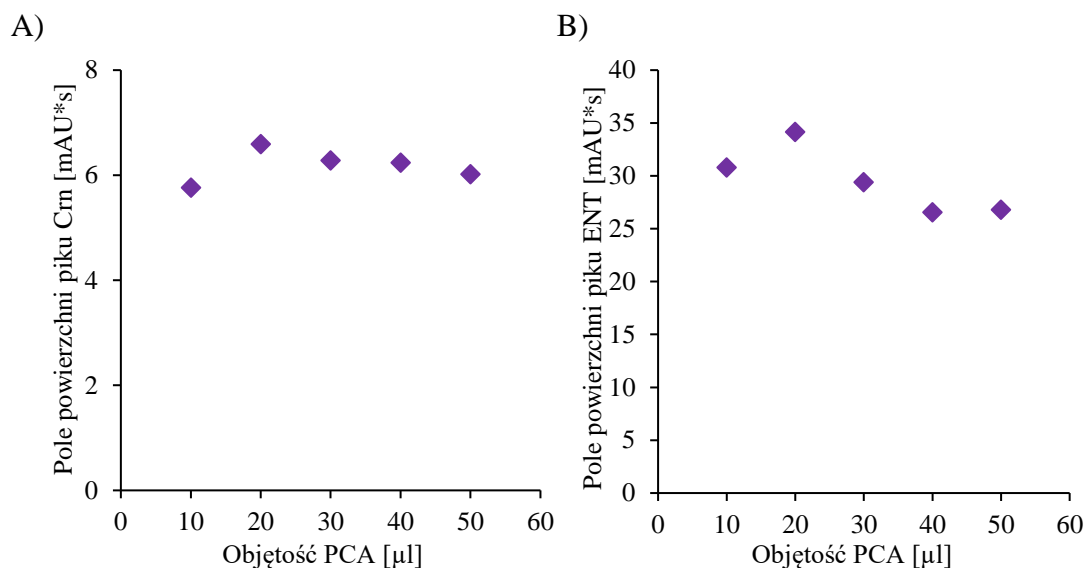
**Ryc. 46.** Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B),  $n = 3$ .

W toku przeprowadzonych badań okazało się, iż pH zastosowanej fazy ruchomej wpływa na wielkość sygnału analitycznego pochodzącego od ENT. Podobnie jak w przypadku próbek moczu, największe wartości otrzymywane są w przedziale pH 7,6-8. W przypadku Crn pH fazy ruchomej nie wpływa na pole powierzchni sygnału. W odniesieniu do czasów retencji pików Crn i ENT, pH fazy ruchomej nie warunkuje różnic, a niewielkie wahania nie wpływają na jakość przeprowadzanej analizy.

Znając optymalne parametry stężenia i pH PB wchodzącego w skład fazy ruchomej dopracowano warunki elucji gradientowej. Uwzględniając złożoność badanej matrycy, końcowy wynik doboru warunków rozdzielania chromatograficznego w osoczu wskazywał, że najbardziej korzystnym będzie zastosowanie fazy ruchomej składającej się z PB o stężeniu  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,8 i MeCN. Zastosowanie kolumny LiChrosorb RP-18, a także elucji gradientowej o następującym profilu 0-2 min 3-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN i 4-7 min 8-3% MeCN. Dzięki zastosowaniu gradientu długości fali (0-3,5 min 234 nm i 3,5-7 min 254 nm) możliwa była optymalna detekcja obu składników próbki w jednym toku analizy.

#### ***Przygotowanie próbki osocza do analizy***

Przygotowanie próbki do analizy w opracowanej metodzie nie wymagało skomplikowanej procedury i składało się z dwóch etapów, tj. rozcieńczenia próbki osocza i deprotenizacji białek w nim się znajdujących. Zbadano wpływ odczynnika strącającego,  $3 \text{ mol l}^{-1}$  PCA, na jakość uzyskanych sygnałów Crn i ENT. W tym celu do 50  $\mu\text{l}$  próbki osocza dodawano 20  $\mu\text{l}$  ENT o stężeniu  $7,5 \text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ , kolejno 10  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{l}$ , 30  $\mu\text{l}$ , 40  $\mu\text{l}$  i 50  $\mu\text{l}$  PCA, uzupełniano do końcowej objętości 500  $\mu\text{l}$  buforem będącym składnikiem fazy ruchomej (PB o stężeniu  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  i pH 7,8). Próbki odwirowywano w temperaturze  $4^\circ\text{C}$  przez 10 minut stosując prędkość wirowania  $12000 \text{ obr min}^{-1}$ . Pobierano 100  $\mu\text{l}$  supernatantu, a 10  $\mu\text{l}$  poddawano analizie chromatograficznej. Otrzymane wyniki zaprezentowano na Ryc. 47.

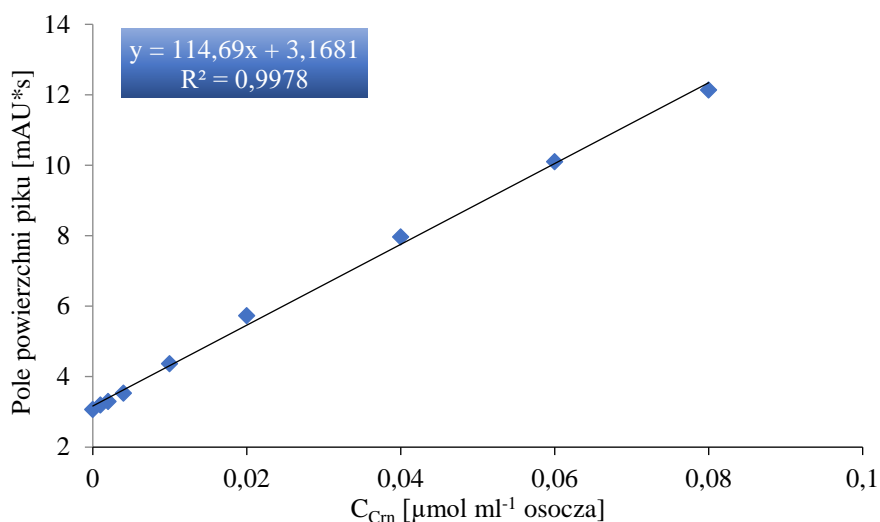


**Ryc. 47.** Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na pole powierzchni sygnałów Crn (A) i ENT (B) w próbkach osocza krwi człowieka,  $n = 3$ .

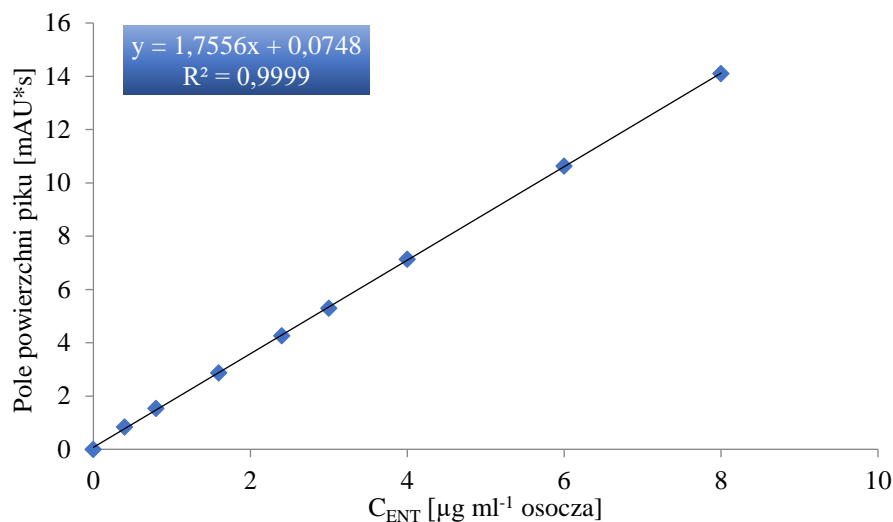
Zaobserwowano, że dodanie 20  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA skutkowało całkowitym wytrąceniem białka z osocza i powodowało uzyskanie największych sygnałów w obydwu przypadkach. Dodatkowo, wraz ze wzrostem zakwaszenia próbki, zaobserwowano wzrost poziomu szumów tła. Wyższe szумы linii bazowej na chromatogramie negatywnie wpływają podczas wyznaczania stosunku S/N, w konsekwencji powodując zwiększenie LOD i LOQ. W trakcie prowadzenia analiz nie zaobserwowano wzrostu ciśnienia na kolumnie chromatograficznej oraz pogorszenia jakości otrzymywanych sygnałów przy zastosowaniu 20  $\mu\text{l}$  odczynnika deprotenizującego białko w próbce.

#### **Walidacja opracowanej metody**

Opracowana metoda oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza krwi wykazuje dobrą liniowość w całym zakresie badanych stężeń 0,4 – 8  $\mu\text{g ml}^{-1}$  osocza dla ENT i 0,001 – 0,08  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  osocza dla Crn (Ryc. 51, 52). Krzywe kalibracyjne sporządzono na podstawie uśrednionych wartości pól powierzchni pików pochodzących z analizy trzech serii pomiarowych. Próbki przygotowano w następujący sposób: do 50  $\mu\text{l}$  osocza dodawano 20  $\mu\text{l}$  roztworów standardowych ENT (1, 2, 4, 6, 7,5, 10, 15, 20  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) i 20  $\mu\text{l}$  Crn o stężeniach 0,0025, 0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2  $\mu\text{mol ml}^{-1}$ . Następnie wprowadzano 20  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA i uzupełniono do końcowej objętości 500  $\mu\text{l}$  PB (0,01  $\text{mol l}^{-1}$  i pH 7,8). Próbki wirowano przez 10 min w temp. 4°C przy prędkości 12000 obr  $\text{min}^{-1}$ . Następnie pobrano 100  $\mu\text{l}$  supernatantu, a 10  $\mu\text{l}$  wprowadzono na kolumnę chromatograficzną.



**Ryc. 48.** Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia Crn w próbce osocza,  $n = 3$ .



**Ryc. 49.** Krzywa kalibracyjna dla ENT sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w próbce osocza,  $n = 3$ .

Parametry walidacyjne zostały zebrane i przedstawione w tabeli 17. Wartości RSD dla Crn wynosiły od 2,6 do 7,1%, i dla ENT od 2,4 do 9,6%. Odzyski mieściły się w granicach 99,1-114,6% dla Crn oraz 100,4-109,6% dla ENT. Otrzymane wyniki sugerują wysoką dokładność i precyzję opracowanej metody, a także spełniają wymagania walidacyjne stawiane próbkom biologicznym.

**Tabela 17.** Wyniki procedury walidacyjnej metody oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza, n = 3.

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
<b>ENT</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,4 – 8	$y=1,756+0,0748x$	0,9999	2,4	9,6	100,4	109,6
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ osocza]	0,001 – 0,08	$y=114,69+3,168x$	0,9989	2,6	7,1	99,1	114,6

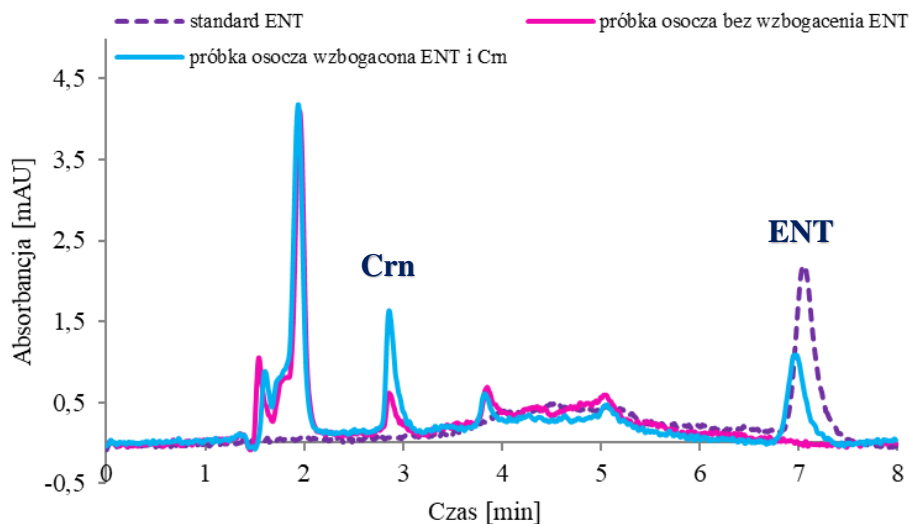
Analogicznie, tak jak w przypadku metod oznaczania ENT i Crn w moczu dla każdego analitu wyznaczono wartości precyzji i dokładności wewnątrz i między-dniowej, a także LOD i LOQ (str. 94-95). Wartości LOD i LOQ opracowanej metody oznaczania Crn i ENT w osoczu wynoszą odpowiednio 0,24 i 0,4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  osocza dla ENT oraz 0,0004 i 0,001  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  osocza dla Crn. Wyniki precyzji i dokładności zestawiono w tabeli 18.

**Tabela 18.** Precyzja i dokładność wewnątrz- i między-dniowa metody oznaczania Crn i ENT w osoczu, n = 3.

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
<b>ENT</b> [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,8	9,2	9,9	108,6	106,2
	3	6,8	4,1	102,4	98,1
	8	2,8	5,3	98,4	97,2
<b>Crn</b> [ $\mu\text{mol ml}^{-1}$ osocza]	0,002	7,7	5,2	114,2	107,9
	0,02	5,2	6,1	99,7	99,7
	0,08	2,8	4,8	106,4	99,4

Precyzja wewnątrz-dniowa mieści się w przedziałach 2,8-9,2% dla ENT i 2,8-7,7% dla Crn, natomiast dokładność wewnątrz-dniowa w zakresach 98,4-108,6% dla ENT i 99,7-114,2% dla Crn. Między-dniowa precyzja oraz dokładność w przypadku ENT wyniosły odpowiednio 4,1-9,9% i 97,2-106,2%, zaś dla Crn mieściły się w zakresach 4,8-6,1% oraz 99,4-107,9%.

Poniżej zaprezentowano chromatogramy uzyskane w trakcie analiz roztworu standardowego ENT i próbek osocza (Ryc. 50).



**Ryc. 50.** Chromatogramy: roztworu standardowego ENT, próbki osocza osoby zdrowej i osocza osoby zdrowej wzbogaconego Crn i ENT o stężeniach odpowiednio  $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}, 10 \mu\text{m}$ ), elucja gradientowa: 0-2 min 3-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN i 4-7 min 8-3% MeCN, PB ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,8), temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Opracowana, zoptymalizowana metoda oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza pozwala na otrzymanie symetrycznych, dobrze wykształconych sygnałów analitycznych oraz osiągnięcie dobrej rozdzielczości względem pozostałych sygnałów występujących w skomplikowanej matrycy jaką jest osocze. W zaproponowanej metodzie nie ma konieczności stosowania wieloetapowych procedur podczas przygotowania próbki do analizy. Czasy retencji poszczególnych analitów wynosiły: 2,9 minuty dla Crn oraz 7,1 minuty dla ENT.

Zastosowanie opracowanej metody umożliwia oznaczanie Crn i ENT w osoczu w stężeniach  $0,001 \mu\text{mol ml}^{-1}$  osocza dla Crn i  $0,4 \mu\text{g ml}^{-1}$  osocza dla ENT lub większych w czasie nie przekraczającym 8 minut. Należy podkreślić, że opracowana w ramach niniejszej pracy metoda jest jedyną chromatograficzną procedurą umożliwiającą oznaczanie obydwu analitów jednocześnie w osoczu człowieka.



### 10.3. Oznaczanie ENT w próbkach śliny

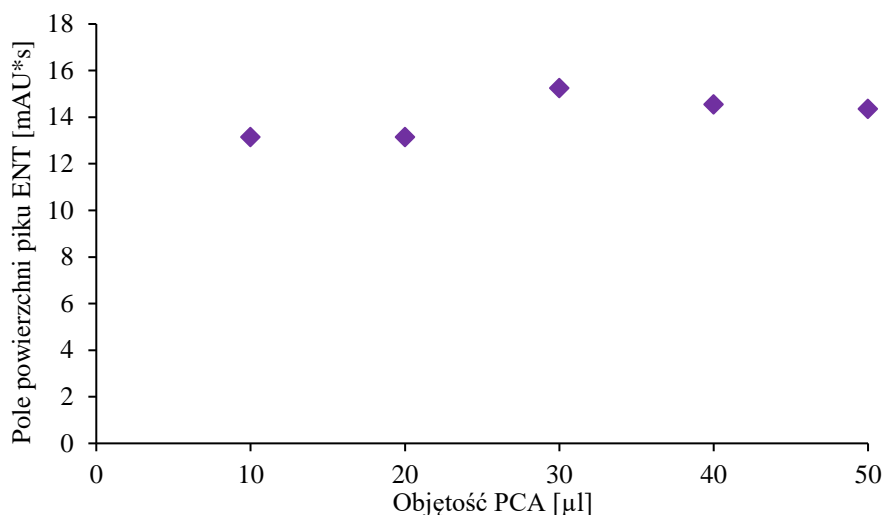
Ze względu na brak danych literaturowych dotyczących wykorzystania śliny jako matrycy w oznaczaniu ENT, w kolejnym etapie niniejszej pracy doktorskiej, zaadaptowano wcześniej zoptymalizowaną na potrzeby badania osocza metodę oznaczenia ENT do próbek śliny. Dokonano niewielkich zmian w profilu gradientu fazy ruchomej oraz procesie przygotowania próbki do analizy. Przeprowadzono walidację metody.

#### *Warunki separacji chromatograficznej*

Wszystkie analizy na próbkach śliny przeprowadzono z wykorzystaniem kolumny chromatograficznej LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 μm). Jako składniki fazy ruchomej wykorzystano PB o stężeniu 0,01 mol<sup>-1</sup> i pH 7,8 oraz MeCN. Niewielka zmiana gradientu fazy ruchomej: 0-2 min 7-10% MeCN, 2-4 min 10% MeCN, 4-5 min 10-7% MeCN, umożliwiła oddzielenie sygnału ENT od innych składników śliny i otrzymanie bardziej symetrycznego, lepiej wykształconego sygnału. Prędkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1,5 ml min<sup>-1</sup>, temperatura kolumny 25°C, a analityczna długość fali detekcji 254 nm.

#### *Przygotowanie próbki śliny do analizy*

Etap ten, podobnie jak w przypadku próbek osocza, obejmował jedynie rozcieńczenie i deprotenizację białek znajdujących się w ślinie. Odbiałczanie próbki przeprowadzono z wykorzystaniem PCA o stężeniu 3 mol l<sup>-1</sup>. Zoptymalizowano objętość kwasu, jaką należy użyć do całkowitego strącenia białek i otrzymania najwyższego sygnału pochodzącego od oznaczanego związku. W tym celu do 100 μl próbki śliny dodawano 20 μl ENT o stężeniu 8 μg ml<sup>-1</sup> i kolejno 10 μl, 20 μl, 30 μl, 40 μl i 50 μl 3 mol l<sup>-1</sup> PCA, dopełniano do objętości 200 μl PB stosowanym jako składnik fazy ruchomej. Próbki odwirowywano w temperaturze 10°C przez 10 minut stosując prędkość wirowania 12000 obr min<sup>-1</sup>, a otrzymany supernatant przeniesiono do fiolek do HPLC. Do kolumny chromatograficznej wprowadzono 10 μl uzyskanego roztworu. Każdą z próbek przygotowano w trzech seriach pomiarowych, a zestawienie otrzymanych wyników zaprezentowano poniżej (Ryc. 51).

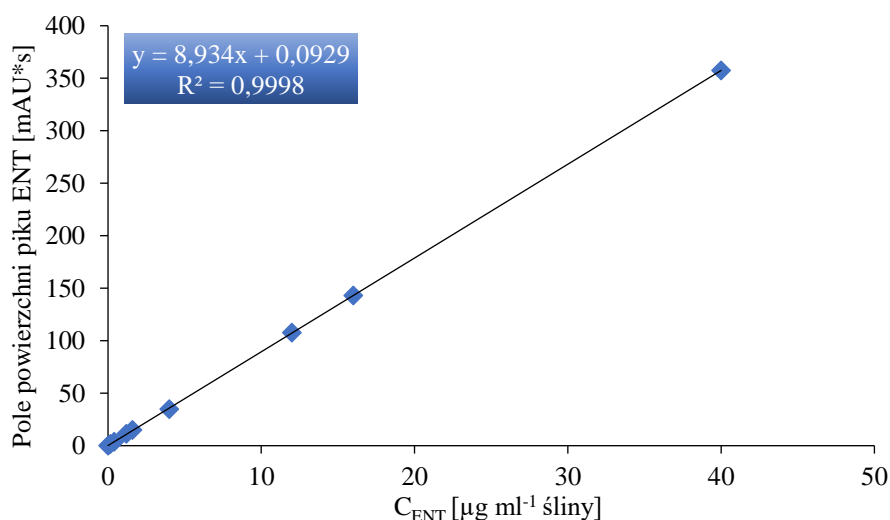


**Ryc. 51.** *Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na zawartość ENT w próbkach śliny, n = 3.*

Wcześniejsze badania (podrozdział 9.2) wykazały, iż dodanie 10 µl 3 mol l<sup>-1</sup> PCA do 100 µl śliny całkowicie wytrąca białko. Ze względu na występujące różnice w wielkości sygnału ENT w próbkach z różnymi objętościami zastosowanego odczynnika strącającego białka do dalszych badań zdecydowano zastosować 30 µl PCA 3 mol l<sup>-1</sup>. Podczas analiz nie zaobserwowano negatywnego wpływu na złożę w kolumnie chromatograficznej czy jakość separacji i identyfikacji sygnału ENT.

#### **Walidacja zaadaptowanej metody**

Podobnie jak podczas eksperymentów prowadzonych na poprzednich matrycach, również w przypadku badań z próbkami śliny konieczne było przeprowadzenie protokołu walidacyjnego. Próbki do krzywej kalibracyjnej przygotowano poprzez dodanie do 100 µl śliny 20 µl roztworu ENT o odpowiednich stężeniach (0,8, 2, 6, 8, 20, 60, 80 i 200 µg ml<sup>-1</sup>) oraz 30 µl PCA i uzupełniono do końcowej objętości 200 µl PB (0,01 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,8). Następnie próbki odwirowano, a uzyskany supernatant poddano analizie chromatograficznej. Otrzymaną krzywą kalibracyjną dla uśrednionych wyników przedstawiono poniżej (Ryc. 52).



**Ryc. 52.** Krzywa kalibracyjna uzyskana dla próbek śliny wzbogaconej ENT,  $n = 3$ .

Sporządzona krzywa kalibracyjna ENT w próbkach śliny wykazuje zależność liniową w badanym zakresie stężeń ( $0,16-40 \mu\text{g ml}^{-1}$  śliny) i charakteryzuje się współczynnikiem korelacji bliskim jedności ( $0,9999$ ). Odpowiednie wyniki przedstawiono w tabeli 19.

**Tabela 19.** Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w próbkach śliny,  $n = 3$ .

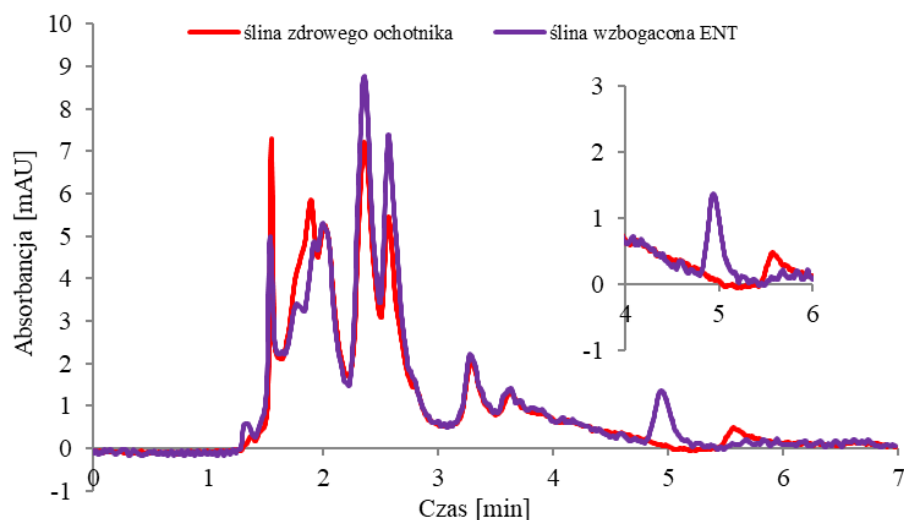
Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,16 – 40	$y=8,934+0,093$	0,9999	3,3	9,9	97,4	105,5

Pozostałe wyniki procedury walidacyjnej takie jak wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej wyznaczono w identyczny sposób jak dla wcześniej opracowanych metod (str. 94-95) i zestawiono w tabeli 20.

**Tabela 20.** Precyzja i dokładność metody oznaczania ENT w ślinie,  $n = 3$ .

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,16	9,5	10,6	105,1	112,4
	1,6	2,4	7,6	93,5	93,8
	40	1,9	4,2	99,5	100,3

Precyzja wewnątrz-dniowa oraz dokładność mieściły się odpowiednio w przedziałach 1,9-9,5% i 93,5-105,1%. Między-dniowa precyzja oraz dokładność wyniosły odpowiednio 4,2–10,6% i 93,8–112,4%. Wyznaczona doświadczalnie, analogicznie jak w poprzednich procesach walidacji (str. 94-95), granica wykrywalności ENT wynosiła  $0,08 \mu\text{g ml}^{-1}$  śliny, natomiast granica oznaczalności wynosiła  $0,16 \mu\text{g ml}^{-1}$  śliny. Poniżej (Ryc. 53) zaprezentowano chromatogramy próbki śliny i śliny z dodatkiem ENT o stężeniu  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ .



**Ryc. 53.** Chromatogramy otrzymane dla próbki śliny zdrowego ochotnika oraz śliny wzbogaconej standardem ENT o stężeniu  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 ( $250 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $10 \mu\text{m}$ ), elucja gradientowa: 0-2 min 7-10% MeCN, 2-4 min 10% MeCN, 4-5 min 10-7% MeCN, PB ( $0,01 \text{ mol l}^{-1}$ , pH 7,8), temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,5 \text{ ml min}^{-1}$ .

Jak można zauważyć na zamieszczonych chromatogramach, pik pochodzący od ENT eluował w 5 minucie analizy, gdzie w próbce śliny nie zawierającej analitu nie są obserwowane piki od składników matrycy. Badania selektywności zostały przeprowadzone na sześciu próbkach śliny pochodzących od zdrowych ochotników. W celu potwierdzenia tożsamości uzyskanego sygnału, porównywano czasy retencji oraz otrzymywane widma UV próbki wzbogaconej ENT i próbki roztworu standardu ENT. Otrzymane wyniki wskazują, że zaproponowana metoda chromatograficzna może stać się użytecznym narzędziem podczas rutynowego oznaczania ENT w próbkach śliny. Brak konieczności skomplikowanego przygotowania próbki oraz prosta analiza końcowa są głównymi atutami zaproponowanej procedury analitycznej.

## 11. OZNACZANIE ENT Z WYKORZYSTANIEM DETEKCJI SPEKTROFLUORYMETRYCZNEJ

Chorobotwórcze wirusy (HIV i HBV) przyczyniają się do cierpienia i śmierci milionów ludzi na całym świecie. Rozwój nowych metod analitycznych pozwalających na określenie zawartości leków stosowanych w terapii HIV/HBV może przyczynić się do poszerzenia wiedzy na temat wpływu leczenia przeciwwirusowego na organizmy żywe, zrozumienia farmakokinetyki wydalania do płynów biologicznych, bioakumulacji, funkcjonowania nerek i co najważniejsze - bezpieczeństwa dla pacjentów.

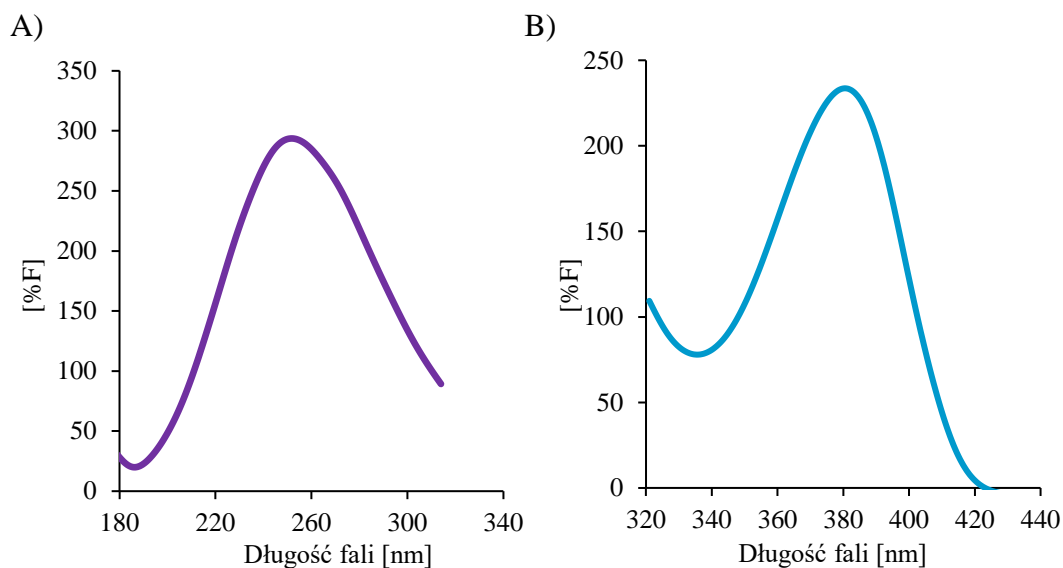
W związku z powyższym, kolejnym z celów prezentowanej pracy doktorskiej było opracowanie chromatograficznych metod oznaczania TFV i ENT w próbkach moczu, osocza oraz śliny z wykorzystaniem bardziej selektywnego i czułego, w porównaniu z detektorem UV-VIS, detektora spektrofluorescencyjnego. Niestety, w toku prowadzonych badań możliwe było opracowanie i zoptymalizowanie procedur oznaczania jednego z dwóch wybranych analitów. Separacja i identyfikacja TFV z wykorzystaniem detektora FLD i reakcji derywatywacji nie przyniosła efektów w postaci otrzymania sygnału pochodzącego od badanego związku.

W niniejszym rozdziale przedstawiono procedury optymalizacji chromatograficznych metod separacji i identyfikacji ENT w próbkach moczu, osocza oraz śliny. Zastosowanie detektora FLD umożliwiło obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności z zachowaniem dużej dokładności i precyzji.

### 11.1. Opracowanie metody oznaczenia ENT w moczu

#### *Wybór analitycznej długości fali*

Ze względu na naturalne zdolności ENT do fluorescencji, pierwszym krokiem było wyznaczenie odpowiednich długości fali wzbudzenia i emisji. Badania przeprowadzono na próbce standardu ENT o stężeniu  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Widma fluorescencyjne były rejestrowane w realnym czasie analizy chromatograficznej z wykorzystaniem następujących warunków: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja izokratyczna, faza ruchoma zawierająca MeCN (10%) i 1% kwas octowy (90%), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ , objętość wprowadzanej próbki  $10 \mu\text{l}$ . Na podstawie otrzymanych widm (Ryc. 54), możliwe było określenie maksimum fluorescencji,  $254 \text{ nm}$  – długości fali wzbudzenia i  $380 \text{ nm}$  – długość fali emisji.



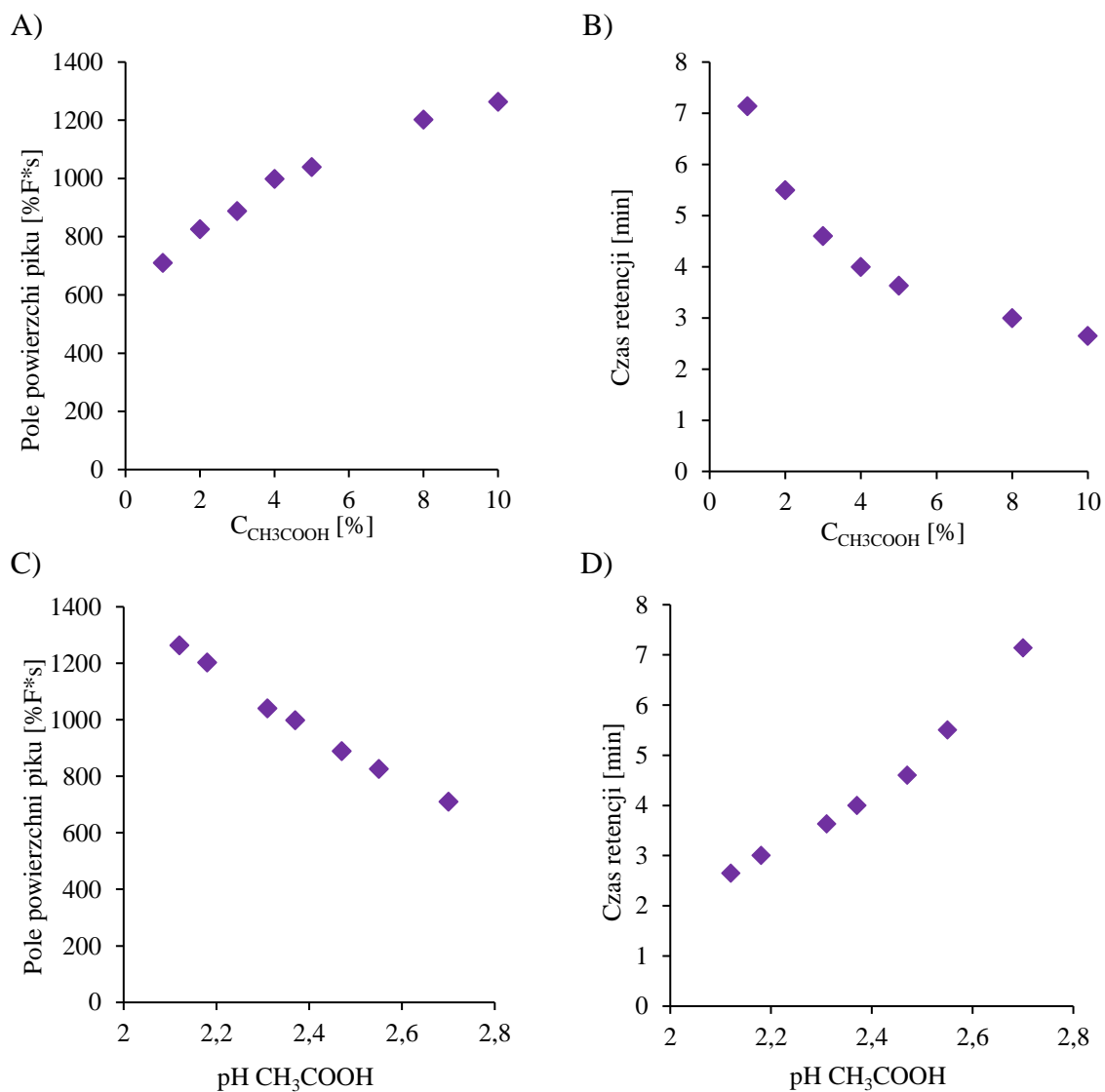
**Ryc. 54.** Widma wzbudzenia (A) i emisji (B) ENT zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej. Warunki HPLC: PolymerX (150 × 4,6 mm, 5 μm), elucja izokratyczna, faza ruchoma: MeCN (10%) i 1% kwas octowy (90%), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 ml min<sup>-1</sup>, temperatura kolumny 25°C.

### **Dobór warunków chromatograficznych**

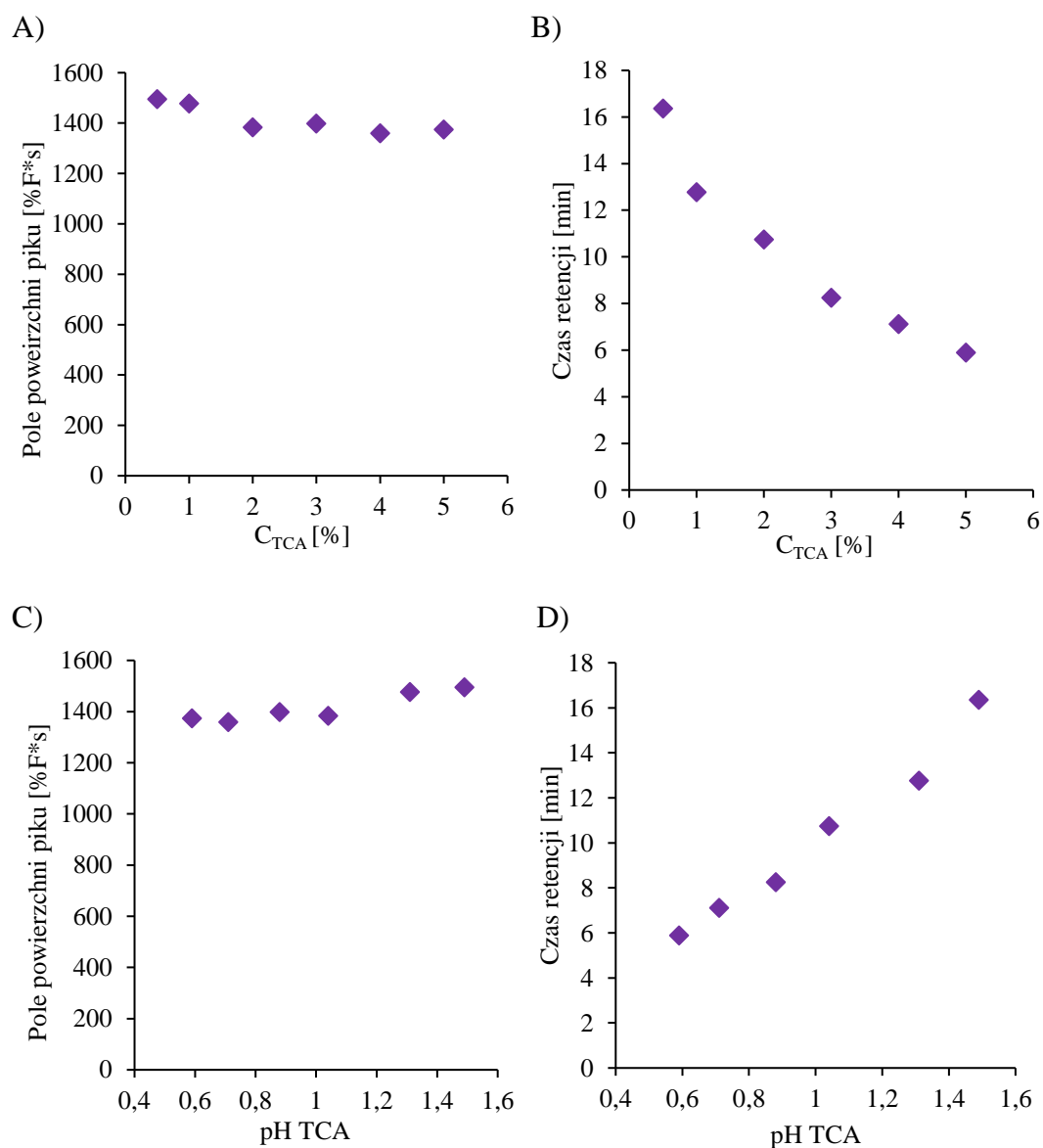
Pierwszy, fundamentalny etap rozwijania nowej metody chromatograficznej rozpoczęto od ustalenia optymalnych warunków umożliwiających separację i detekcję analitu. W tym celu dokonano wyboru długości fal wzbudzenia i emisji, odpowiedniej kolumny chromatograficznej, składu fazy ruchomej. Żmudne i czasochłonne badania ujawniły znaczący wpływ składu, stężenia i pH fazy ruchomej na ostateczne wyniki separacji ENT. Wybór odpowiedniej kolumny zdeteminowany został poprzez szeroki zakres pH w jakim może ona pracować. Ze względu na wykorzystanie w badaniach bardzo kwaśnej fazy ruchomej, koniecznym stało się zastosowanie kolumny chromatograficznej pracującej w pH ≤ 1. Warunek ten spełnia kolumna PolymerX, składająca się z mikroporowatego polistyrenu diwinylobenzenu, który wykazuje podobne właściwości jak kolumny typu C18.

W trakcie optymalizacji parametrów separacji chromatograficznej zbadano wpływ rodzaju fazy ruchomej, jej stężenia oraz odpowiadającej wartości pH, na jakość rozdzielania i czasy retencji sygnału pochodzącego od ENT. Zbadano różne typy faz wodnych: kwas octowy w zakresie stężeń od 1 do 10% i pH 2,12 do 2,70, kwas trichlorooctowy od 0,5 do 5% i pH 0,59 do 1,49 oraz kwas solny w zakresie od 0,001 do 0,3% i pH 0,98 do 2,1. Pozostałe parametry chromatograficzne to MeOH (12%), elucja izokratyczna i prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 ml min<sup>-1</sup>, a temperatura kolumny

25°C. Badania prowadzono na próbkach moczu przygotowanych w następujący sposób: 50 µl moczu zmieszano z 10 µl standardu ENT o stężeniu 200 µg ml<sup>-1</sup> i rozcieńczono wodą dejonizowaną do końcowej objętości 200 µl. Próbki przygotowano i analizowano w trzech seriach pomiarowych. Na podstawie uzyskanych wyników wykreślono poniższe zależności (Ryc. 55-57).

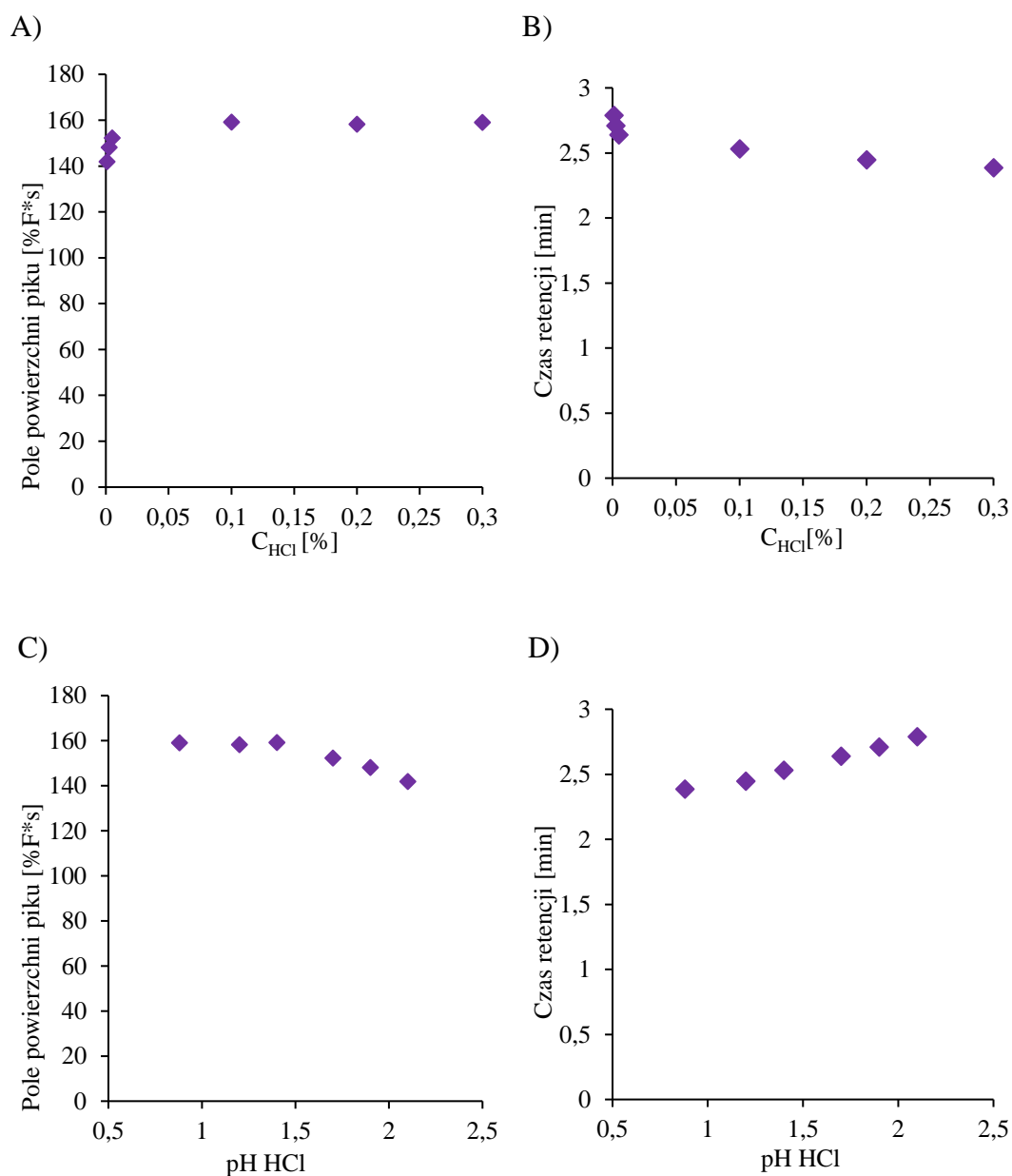


**Ryc. 55.** Wpływ stężenia kwasu octowego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu octowego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT,  $n = 3$ .



**Ryc. 56.** Wpływ stężenia kwasu trichlorooctowego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu trichlorooctowego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT,  $n = 3$ .





**Ryc. 57.** Wpływ stężenia kwasu solnego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu solnego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT,  $n = 3$ .

Na podstawie otrzymanych zależności pól powierzchni pików od rodzaju i stężenia kwasu w fazie ruchomej stwierdzono, że zarówno rodzaj, stężenie jak i wartość pH znacząco wpływały na czas retencji sygnału ENT. Im wyższe stężenie kwasu i niższe jego pH tym krótszy czas retencji. W przypadku próbek moczu zdecydowano się zastosować kwas TCA o stężeniu 1% jako składnik fazy ruchomej. W dalszym postępowaniu zbadano wpływ modyfikatorów organicznych takich jak MeOH oraz MeCN. Optymalne rozdzielnie eluowanego związku uzyskano wykorzystując jako modyfikator organiczny MeOH. Przeprowadzone eksperymenty wskazały, że najlepszą

jakość separacji ENT w próbkach moczu od pozostałych składników matrycy można uzyskać stosując jako fazę ruchomą 1% roztwór TCA (88%) oraz MeOH (12%) wykorzystując elucję izokratyczną i prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$  w temperaturze kolumny  $25^\circ\text{C}$ .

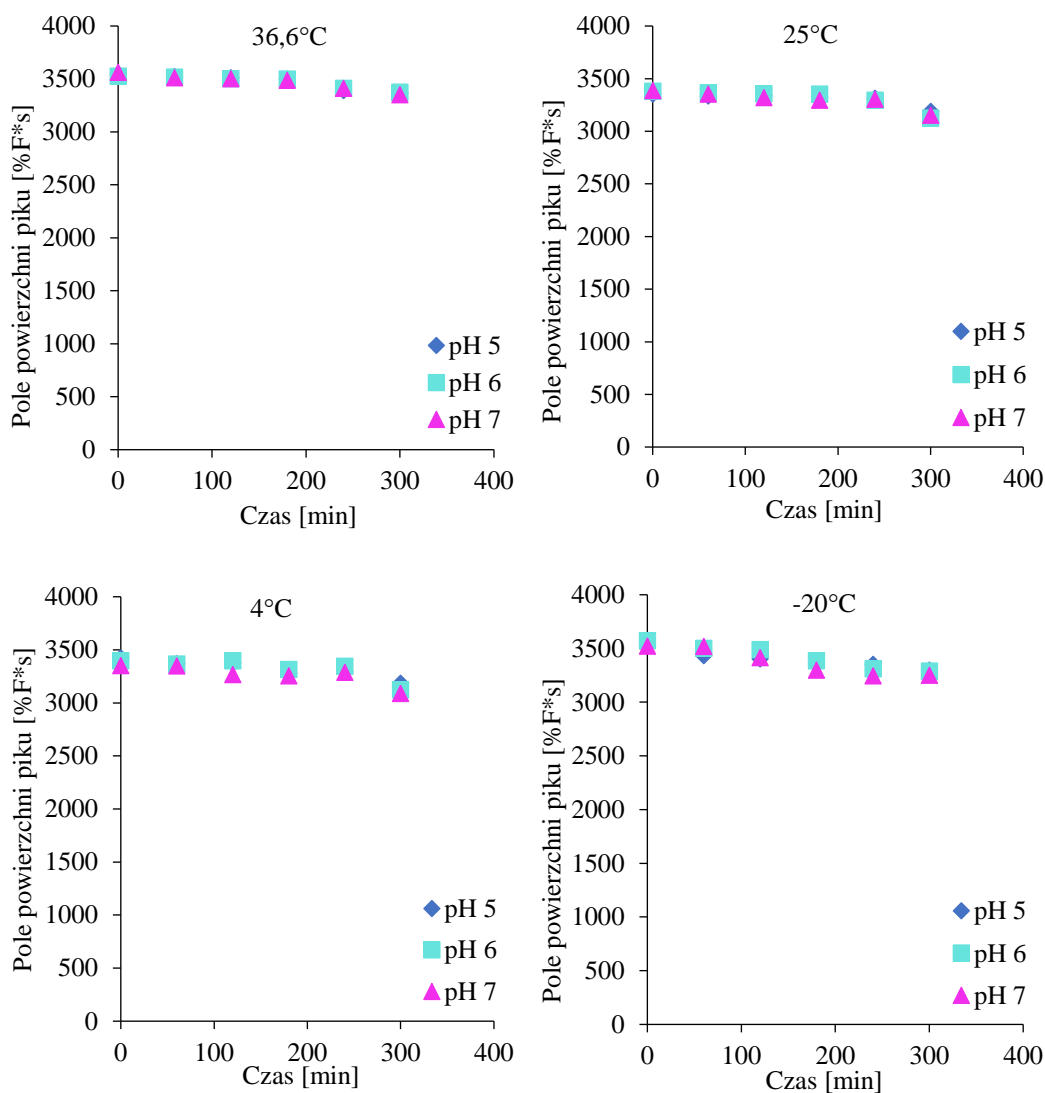
#### ***Przygotowanie próbki do analizy***

Ze względu na strukturalne właściwości ENT, które umożliwiły bezpośrednią detekcję fluorescencyjną, etap przygotowania próbki do analizy ograniczał się jedynie do 4-krotnego rozcieńczenia próbki moczu wodą dejonizowaną. Powyższy sposób przygotowania umożliwił uzyskanie rzetelnych wyników separacji i identyfikacji wybranego analitu w moczu.

#### ***Badanie trwałości ENT w moczu***

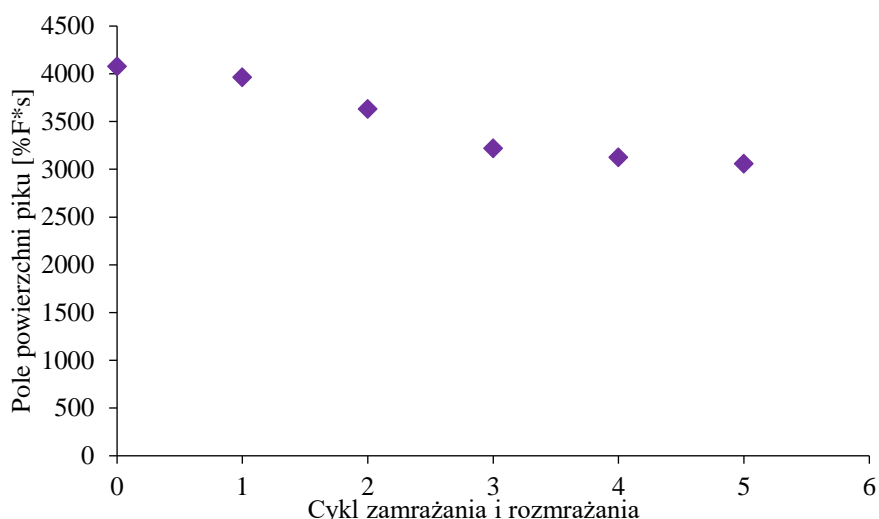
Kolejnym etapem badań, było zbadanie trwałości analitu w próbkach moczu o różnych wartościach pH (5, 6, 7) dla czterech testowanych temperatur ( $36,6$ ,  $25$ ,  $4$ ,  $-20^\circ\text{C}$ ) w czasie 300 minut. Testy te są podstawą do określenia trwałości leku w określonych warunkach przechowywania próby przed jej końcową analizą, a dodatkowo, sprawdzono czy wartość pH próbki moczu ma wpływ na trwałość badanego związku. Próbki do badań wykonano poprzez dodanie do próbki moczu o odpowiednim pH  $10 \mu\text{l}$  roztworu ENT o stężeniu  $200 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Następnie przed samą analizą pobierano  $50 \mu\text{l}$  próbki moczu wzbogaconej ENT i rozcieńczano 4-krotnie wodą dejonizowaną. Mieszano przy użyciu *vortexu* i od razu poddawano analizie chromatograficznej. Badania trwałości wykonywano w interwałach 60 minutowych, a wyniki otrzymanych analiz zestawiono poniżej (Ryc. 58).

Otrzymane wyniki wykazały brak znaczącej zmienności pola powierzchni pików analitu, co pozwoliło potwierdzić trwałość ENT w moczu niezależnie od wartości pH próbki. W badanym przedziale czasowym (300 min) dla próbek inkubowanych w temperaturze  $36,6^\circ\text{C}$  spadek zawartości ENT w porównaniu z wartością wyjściową wyniósł  $6,1\%$ , dla  $25^\circ\text{C}$  było to  $7,8\%$ , w przypadku temperatury  $4^\circ\text{C}$  odnotowano  $7,7\%$  ubytku, zaś dla  $-20^\circ\text{C}$  było to  $7,2\%$  straty analitu. Przeprowadzone testy wskazały, iż ENT poddany działaniu czynników zewnętrznych w próbkach moczu w czasie 300 minut pozostaje stabilny, a strata nie przekracza  $8\%$ .



**Ryc. 58.** Stabilność ENT w moczu o różnym pH przechowywanym w temperaturze 36,6, 25, 4 i -20°C przez okres 300 min,  $n = 3$ .

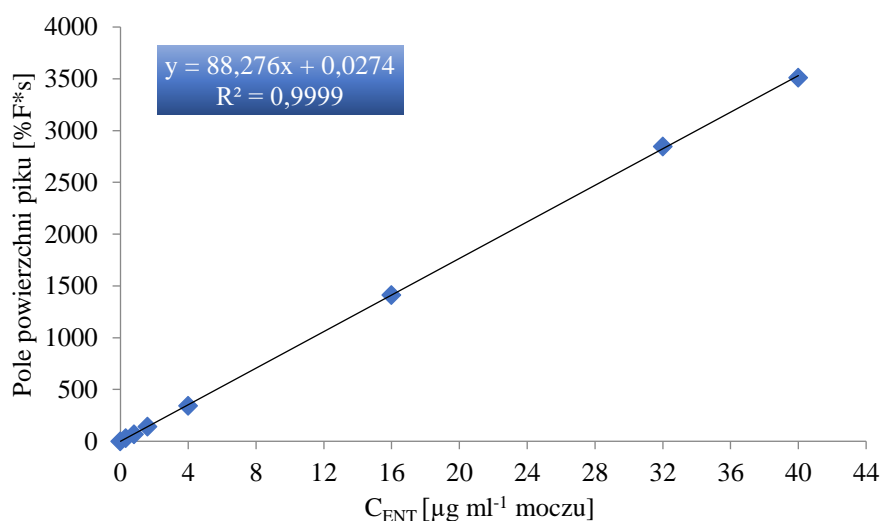
Zbadany został również wpływ zamrażania próbki moczu z dodatkiem ENT w 5 cyklach w temperaturze -20°C i rozmrażania w temperaturze 4°C. Uzyskane rezultaty wskazały, iż wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbki moczu nie jest wskazane, ponieważ powoduje znaczną degradację badanego analitu. Po pierwszym cyklu rozmrażania próbki obserwowany jest spadek zawartości ENT o 2,8%, po drugim o 9,2%, a po 5-cyklu eksperymentu spadek zawartości analitu jest znaczący i oscyluje na poziomie 24,9% (Ryc. 59).



**Ryc. 59.** Trwałość ENT w próbce moczu po kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$  i rozmrożeniu w  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $n = 3$ .

#### Walidacja opracowanej metody

Opracowana procedura oznaczania ENT w moczu została poddana procesowi walidacji obejmującemu określenie granic wykrywalności i oznaczalności, wyznaczenie zakresu liniowości metody, a także jej dokładności i precyzji. Krzywą wykonano w zakresie stężeń  $0,32 - 40 \mu\text{g ml}^{-1}$  moczu. Analiza dotyczyła 3 serii próbek moczu ( $50 \mu\text{l}$ ) wzbogaconych  $10 \mu\text{l}$  standardu ENT w siedmiu różnych stężeniach 1,6, 4, 8, 20, 80,  $160, 200 \mu\text{g ml}^{-1}$ , uzupełnionych wodą do końcowej objętości  $200 \mu\text{l}$ . Tak przygotowane próbki analizowano z wykorzystaniem chromatografu cieczowego. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinie 60 i w tabeli 21.



**Ryc. 60.** Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w moczu,  $n = 3$ .

**Tabela 21.** Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w próbkach moczu, n = 3.

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R <sup>2</sup>	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
ENT [µg ml <sup>-1</sup> mocz]	0,32 – 40	y=88,276+0,0274	0,9999	2,0	10,7	95,4	113,6

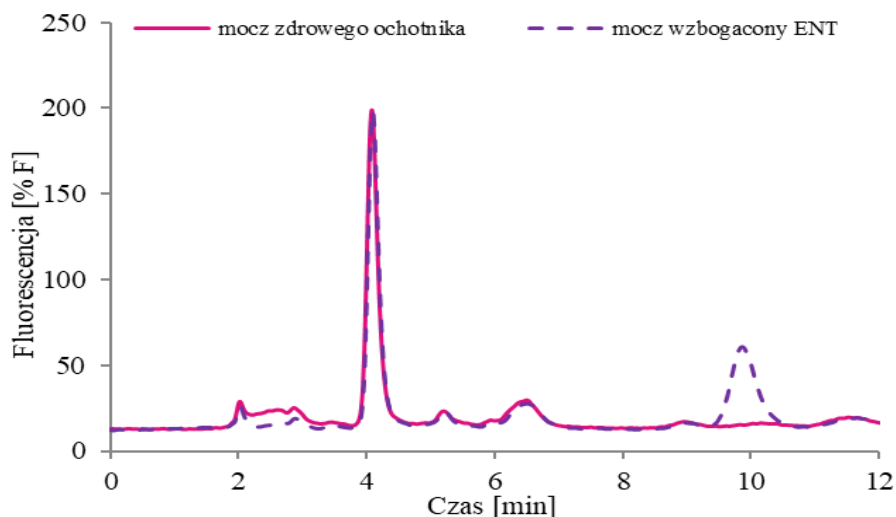
Wszystkie parametry walidacji wyznaczono analogicznie, jak w przypadku poprzednich metod (str. 94-95). Wyznaczone wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej opracowanej metody uzyskane dla wybranych stężeń zastosowanej krzywej kalibracyjnej przedstawiono w tabeli 22.

**Tabela 22.** Precyzja i dokładność metody oznaczania ENT w moczu, n = 3.

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
ENT [µg ml <sup>-1</sup> mocz]	0,32	3,8	7,2	95,4	93,8
	4	2,1	2,7	93,9	95,6
	40	1,3	4,4	101,8	100,5

Wartości precyzji i dokładności wewnątrz-dniowej mieściły się odpowiednio w zakresach od 1,3-3,8% i 93,9-101,8%, zaś dla precyzji i dokładności między-dniowej odpowiednio w przedziałach 2,7-7,2% oraz 93,8-100,5%. Wartości LOD i LOQ opracowanej metody oznaczania ENT w moczu wyznaczono eksperymentalnie i wynoszą odpowiednio 0,12 i 0,32 µg ml<sup>-1</sup> moczu.

Zaprezentowana chromatograficzna metoda oznaczania ENT w próbkach moczu z wykorzystaniem detekcji fluorescencyjnej pozwala na otrzymanie niższych wartości LOD i LOQ w porównaniu z wcześniej opracowaną metodyką wykorzystującą detektor UV. Ponadto, zoptymalizowane warunki separacji umożliwiają uzyskanie symetrycznego, dobrze wykształconego sygnału ENT, bez konieczności stosowania skomplikowanych procedur przygotowania próbki do analizy. Czas retencji ENT odpowiadał wartości 9,8 minuty, a całkowity czas analizy próbki wyniósł 12,5 minuty. Należy podkreślić, że opracowana metoda jest jedyną chromatograficzną procedurą umożliwiającą oznaczanie ENT z wykorzystaniem detekcji spektrofлуorymetrycznej. Chromatogramy uzyskane w trakcie badań dla próbki moczu zdrowego ochotnika i moczu wzbogaconego ENT o stężeniu 4 µg ml<sup>-1</sup> przedstawiono poniżej (Ryc. 61).



**Ryc. 61.** Chromatogramy otrzymane dla próbki moczu zdrowego ochotnika bez wzbogacenia oraz moczu wzbogaconego ENT o stężeniu  $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja izokratyczna, faza ruchoma: 1% roztwór TCA (88%) oraz MeOH (12%), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ .

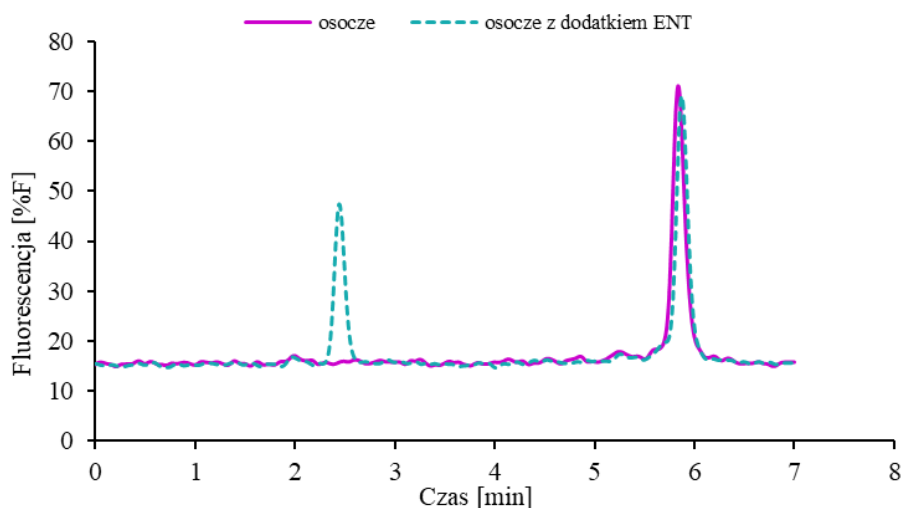
## 11.2. Rozwinięcie metody separacji i identyfikacji ENT w osoczu krwi i ślinie

Naturalne zdolności ENT do fluorescencji i brak konieczności wprowadzania etapu derywatywacji próbki, znacząco skracają proces przygotowania próbki do analizy, a co się z tym wiąże, cały protokół analityczny. Duża dokładność, specyficzność i selektywność detektorów FLD umożliwia otrzymanie niskich granic wykrywalności i oznaczalności przy dużej dokładności i precyzji pomiarów, z wykorzystaniem powszechnie występującej aparatury badawczej. Dodatkowo, ze względu na brak informacji w literaturze dotyczących metod oznaczania ENT w osoczu i próbkach śliny z wykorzystaniem detekcji FLD, zdecydowano o zaadaptowaniu do tych matryc procedury wykorzystywanej w trakcie optymalizowania metody dla próbek moczu.

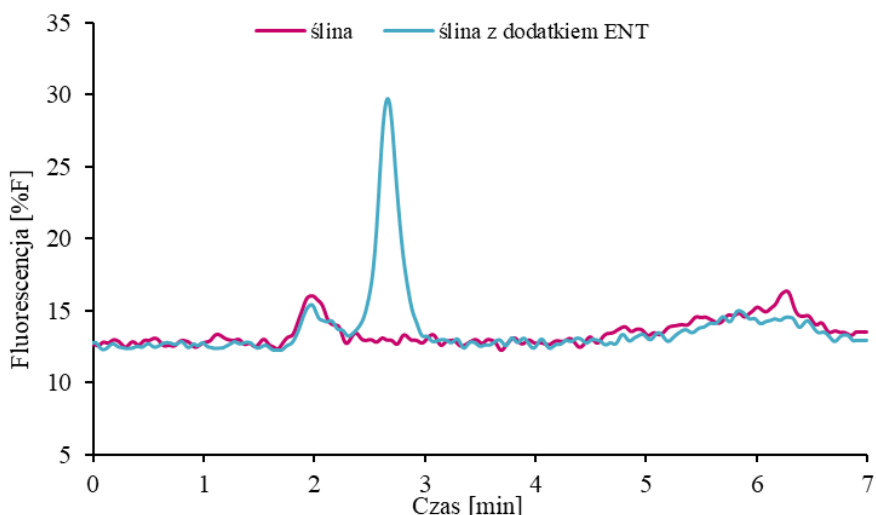
### *Adaptacja warunków rozdzielania chromatograficznego*

Podczas eksperymentów zaobserwowano, iż w próbkach zarówno osocza jak i śliny znajduje się znacznie mniej w porównaniu do moczu, związków wykazujących zdolności fluorescencji przy wybranych długościach fali wzbudzenia i emisji. Z tego względu warunki rozdzielania chromatograficznego dobrano tak, aby możliwie jak najbardziej skrócić czas analizy, jednocześnie uzyskując zadowalającą rozdzielczość i kształt sygnałów analitycznych. Do badań zastosowano kolumnę chromatograficzną PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ) oraz fazę ruchomą składającą się z MeOH składnik (A)

oraz 0,1% HCl składnik (B). Analizę prowadzono w trybie elucji gradientowej (0–1 min, 20% (A); 1–3 min, 20-40% (A); 3-5 min 40-20% (A); 5-7 min 20% (A) - czas rekondycjonowania kolumny), stosując objętościową prędkość przepływu  $1 \text{ ml min}^{-1}$  i temperaturę kolumny  $25^\circ\text{C}$ . W eksperymencie wykorzystano próbki osocza i śliny przygotowane w następujący sposób: do  $100 \mu\text{l}$  próbki osocza/śliny dodano  $30 \mu\text{l}$  PCA o stężeniu  $3 \text{ mol l}^{-1}$ ,  $20 \mu\text{l}$  ENT o stężeniu  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  w przypadku osocza i  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  dla śliny i uzupełniano wodą do końcowej objętości  $200 \mu\text{l}$ . Całość wymieszano i odwirowano (10 minut,  $15000 \text{ obr min}^{-1}$ ,  $10^\circ\text{C}$ ).  $10 \mu\text{l}$  uzyskanej próbki wprowadzono do układu pomiarowego. Chromatogramy uzyskane dla próbki osocza i próbki śliny przy zoptymalizowanych warunkach separacji chromatograficznej zaprezentowano na rycinach 62 i 63.



**Ryc. 62.** Chromatogramy próbki osocza od zdrowego ochotnika i osocza wzbogaconego ENT o stężeniu  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), faza ruchoma to 0,1% HCl i MeOH, elucja gradientowa: 0–1 min, 20% (MeOH); 1–3 min, 20-40% (MeOH); 3 -5 min 40-20% (MeOH); 5-7 min 20% (MeOH), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ .

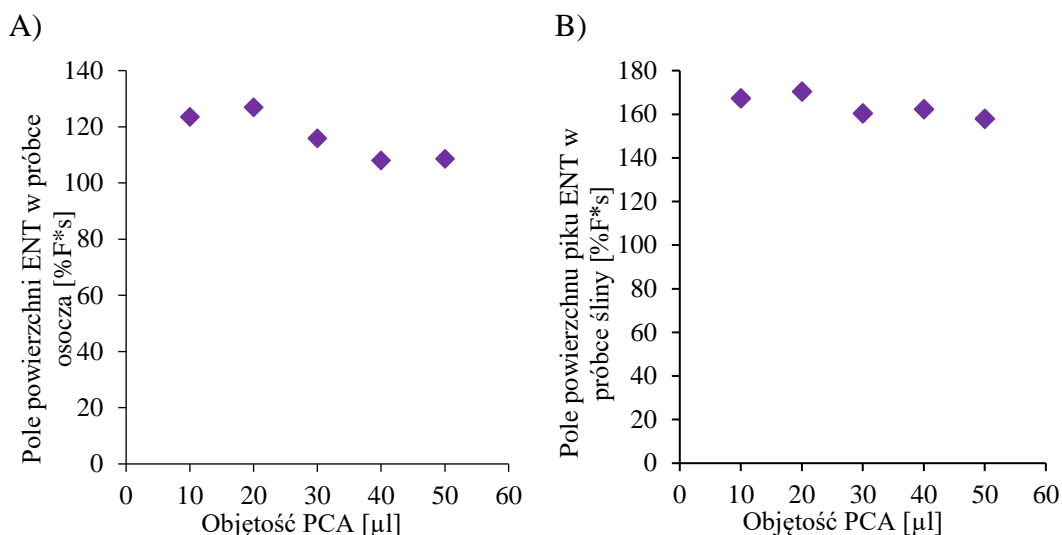


**Ryc. 63.** Chromatogram próbki śliny od zdrowego ochotnika i śliny wzbogaconej ENT o stężeniu  $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), faza ruchoma to  $0,1\%$  HCl i MeOH, elucja gradientowa: 0–1 min, 20% (MeOH); 1–3 min, 20–40% (MeOH); 3–5 min 40–20% (MeOH); 5–7 min 20% (MeOH), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ .

#### **Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej**

Zarówno próbki osocza jak i śliny wymagają przeprowadzenia procesu strącenia białek w nich obecnych. Podobnie, jak w poprzednich przypadkach do etapu deprotenizacji zastosowano dodatek  $3 \text{ mol l}^{-1}$  PCA. Zbadano wpływ jego objętości na wartość sygnału pochodzącego od ENT. W obydwu przypadkach do  $100 \mu\text{l}$  badanej próbki osocze/ślina dodawano  $20 \mu\text{l}$  ENT o stężeniu  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  w przypadku osocza i  $4 \mu\text{g ml}^{-1}$  dla śliny i odpowiednio od  $10 \mu\text{l}$  do  $50 \mu\text{l}$   $3 \text{ mol l}^{-1}$  PCA, całość uzupełniano wodą do końcowej objętości  $200 \mu\text{l}$ . Następnie próbki odwirowywano w temperaturze  $10^\circ\text{C}$  przez 10 minut stosując prędkość wirowania  $15000 \text{ obr min}^{-1}$  w przypadku osocza i  $12000 \text{ obr min}^{-1}$  dla próbek śliny. Każdą z próbek analizowano w trzech powtórzeniach. Otrzymane zależności zaprezentowano na rycinach poniżej (Ryc. 64).





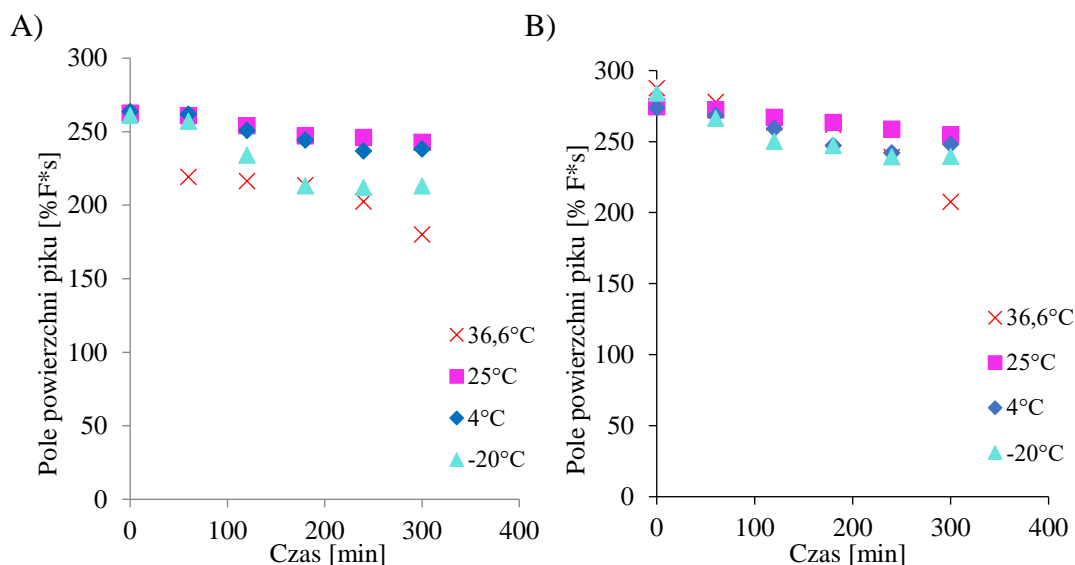
**Ryc. 64.** Wpływ objętości odczynnika strącającego na pole powierzchni sygnału ENT w próbkach osocza krwi (A) oraz śliny (B),  $n = 3$ .

Wcześniejsze badania (podrozdziały 10.2 i 10.3) wykazały, że do deproteinizacji osocza wystarczy dodanie 20 µl 3 mol l<sup>-1</sup> PCA, a do śliny 10 µl czynnika wytrącającego białko. Otrzymane w przeprowadzonym eksperymencie wyniki dla obydwu matryc są tożsame. Największe pola powierzchni sygnału ENT otrzymujemy dla objętości 20 µl PCA. Zwiększanie objętości odczynnika strącającego białko spowodowało spadek powierzchni sygnału analitu. W związku z powyższym w etapie deproteinizacji, zarówno dla próbek osocza jak i śliny dodawano 20 µl odczynnika strącającego białko. W obydwu przypadkach nie zaobserwowano negatywnego wpływu na sprawność kolumny chromatograficznej.

#### **Sprawdzenie stabilności ENT w osoczu**

Na tym etapie badań sprawdzona została trwałość ENT we wzbogaconych próbkach osocza i supernatantu. Próbki osocza do badania uzyskano przez dodanie do 100 µl osocza 20 µl ENT o stężeniu 10 µg ml<sup>-1</sup>. Supernatanty do inkubacji otrzymano dodając do 100 µl osocza 20 µl ENT o stężeniu 10 µg ml<sup>-1</sup> oraz 20 µl 3 mol l<sup>-1</sup> PCA i uzupełniając wodą do końcowej objętości 200 µl, odwirowując z prędkością 15000 obr min<sup>-1</sup> przez 10 min i w temperaturze 4°C. Wzbogacone ENT próbki osocza, jak i ich supernatanty inkubowano w temperaturach 36,6, 25, 4 i -20°C, przez 5 godzin, a testy przeprowadzano w interwałach 60 minutowych. Próbki osocza po inkubacji odbiałczano 20 µl 3 mol l<sup>-1</sup> PCA i uzupełniano wodą do końcowej objętości 200 µl. Bezpośrednio przed analizą próbki odwirowywano (15000 obr min<sup>-1</sup>, 10 min, 4°C). Pobierano 100 µl supernatantu, a 10 µl poddawano analizie HPLC. Do badań zastosowano warunki

chromatograficzne opisane pod ryciną 62. Otrzymane wyniki przedstawiono poniżej (Ryc. 65).



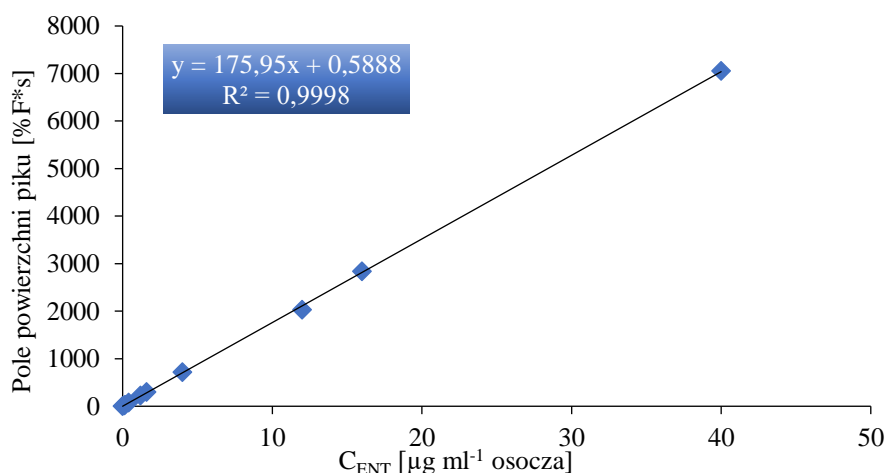
**Ryc. 65.** Stabilność ENT w osoczu (A) i supernatancie osocza (B) przechowywanym w temperaturze 36,6, 25, 4 i -20°C przez okres 300 min, n= 3.

Otrzymane rezultaty wskazują, iż w przypadku inkubacji próbek w temperaturze 36,6 °C już po pierwszej godzinie można zaobserwować spadek zawartości ENT. Dla pozostałych temperatur wartości pozostają stabilne do drugiej godziny eksperymentu. W tym momencie obserwowany jest niewielki spadek zawartości dla próbek inkubowanych w pozostałych temperaturach. Tendencja ta się utrzymuje w ciągu kolejnych godzin trwania eksperymentu, a największy spadek obserwowany jest dla próbek osocza przechowywanych w temperaturze -20°C i wynosi 16,5% wartości wyjściowej oraz dla temperatury 36,6°C aż 27,8%. Możliwe, iż podwyższona temperatura wpływa na proces rozkładu ENT w próbkach biologicznych, a także sam proces zamrażania i rozmrażania próby wpływa na degradację analitu.

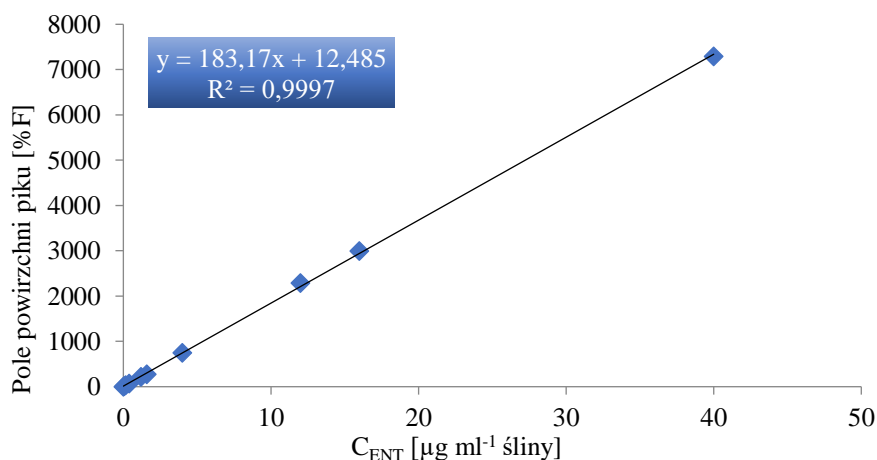
Przeprowadzone eksperymenty wskazały, że ENT w supernatancie osocza inkubowany w każdej z badanych temperatur również ulega częściowej degradacji. Tendencja ta jest porównywalna z uprzednio wyznaczonymi wartościami dla próbek osocza, jednak obserwowane są mniejsze wahania dla poszczególnych punktów pomiarowych. Podobnie jak przypadku osocza, największy spadek zawartości obserwowany jest dla dwóch skrajnych wartości -20°C i 36,6°C. Po 300 minutach degradacja ENT dla -20°C wynosi 14,6% zaś dla 36,6°C aż 22,5%. Są to wartości niższe niż w omawianym powyżej przypadku próbek osocza.

### Walidacja metody

Zoptymalizowane parametry separacji chromatograficznej zostały poddane procesowi walidacji. W tym celu do 100  $\mu\text{l}$  próbki osocza dodawano 20  $\mu\text{l}$  standardu ENT o rosnących stężeniach (0,48, 0,8, 2, 6, 8, 20, 60, 80, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), 20  $\mu\text{l}$  3  $\text{mol l}^{-1}$  PCA oraz uzupełniano do końcowej objętości 200  $\mu\text{l}$  wodą dejonizowaną. Następnie próbki wirowano poprzez 10 min w temperaturze 4°C przy 15000 obr  $\text{min}^{-1}$ , pobierano 100  $\mu\text{l}$  supernatantu, a 10  $\mu\text{l}$  wprowadzano na kolumnę chromatograficzną. W przypadku śliny proces przygotowania próbki był analogiczny. Stężenia ENT używanego do wzbogacenia różniły się jedynie na najniższym poziomie (0,4, 0,8, 2, 6, 8, 20, 60, 80, 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Próbki śliny odwirowano stosując temperaturę 10°C i prędkości 12000 obr  $\text{min}^{-1}$ . Tak przygotowane trzy serie próbek zarówno osocza jak i śliny poddano analizie chromatograficznej. Uzyskane wyniki przedstawiono na rycinach 66, 67 oraz w tabeli 23.



**Ryc. 66.** Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni piku od zawartości ENT w osoczach,  $n = 3$ .



**Ryc. 67.** Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni piku od zawartości ENT próbkach śliny,  $n = 3$ .

**Tabela 23.** Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w osoczu i ślinie, n = 3.

Analit	Zakres liniowości	Równanie prostej	R	RSD [%]		Odzysk [%]	
				Min	Max	Min	Max
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,096 – 40	$y=175,95+0,589x$	0,9999	0,4	6,9	96,2	111,3
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,08 – 40	$y=183,17+12,485x$	0,9998	0,9	5,2	95,5	110,3

Otrzymane zależności dla próbek osocza i śliny w badanych zakresach stężeń 0,096-40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  osocza i 0,08-40  $\mu\text{g ml}^{-1}$  śliny charakteryzowały się liniowością, zadowalającą precyzją i dokładnością w obydwu przypadkach.

Precyzję i dokładność jak również granice oznaczalności i wykrywalności, wyznaczono eksperymentalnie, analogicznie do opisu przedstawionego w podrozdziale 7.4. Uzyskane wyniki precyzji i dokładności przedstawiono w tabeli 24.

**Tabela 24.** Dane walidacyjne dotyczące precyzji oraz dokładności dla próbek osocza i śliny (między-dniowej, wewnątrz-dniowej).

Analit	Stężenie	Precyzja [%]		Dokładność [%]	
		Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa	Wewnątrz-dniowa	Między-dniowa
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ osocza]	0,096	5,6	6,2	110,9	111,3
	1,6	1,7	1,9	106,8	105,4
	40	3,9	5,7	98,9	102,9
ENT [ $\mu\text{g ml}^{-1}$ śliny]	0,08	4,5	4,8	102,8	113,1
	1,6	1,1	2,4	95,5	96,2
	40	2,8	3,1	99,6	98,7

Precyzja wewnątrz-dniowa oraz uzyskane wartości dokładności mieściły się w przedziałach 1,7-5,6% i 98,9-110,9% dla próbek osocza oraz 1,1-4,5% i 95,5-102,8% dla śliny. Między-dniowa precyzja oraz dokładność wyniosły odpowiednio 1,9-6,2% i 102,9–111,3% dla osocza oraz 2,4-4,8% i 96,2-113,1% dla próbek śliny. Granice wykrywalności i oznaczalności dla ENT wyznaczone eksperymentalnie na próbkach osocza oraz śliny wynosiły odpowiednio 0,016  $\mu\text{g ml}^{-1}$  i 0,096  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz 0,04  $\mu\text{g ml}^{-1}$  i 0,08  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Opracowane metody oznaczania ENT w ślinie, moczu i osoczu mogą być zastosowane do badań próbek pochodzących od pacjentów leczonych tym preparatem.

## 12. Dyskusja Wyników

XXI wiek to czas postępu technologicznego, w którym rozwiązywanie problemów współczesnej nauki opiera się na zaangażowaniu całego aparatu badawczego i to już na poziomie molekularnym. Dzięki naukowemu poznaniu występujących zjawisk fizykochemicznych i zachodzących procesów biologicznych, a także intensyfikacji badań w chemii analitycznej jesteśmy świadkami wdrażania zarówno nowych technologii w przemyśle jak i dynamicznego rozwoju medycyny, dla której kluczowe znaczenie ma postęp w diagnostyce medycznej.

Wielowymiarowość technik separacyjnych sprawia, iż stają się one wiarygodnym i precyzyjnym źródłem dostarczania informacji, dlatego też wykorzystywane są w codziennej praktyce laboratoryjnej. Mechanizmy separacji chromatograficznej, zmiany dokonywane podczas prowadzenia eksperymentów, powinny być zawsze dobrze zaplanowane i właściwie interpretowane, bowiem ich zrozumienie to kluczowy element złożonego procesu efektywnego opracowania każdej metody analitycznej. Spośród technik separacyjnych, wysokosprawna chromatografia cieczowa jest jedną z najpowszechniej stosowanych technik analitycznych przeznaczonych zarówno do celów naukowych, jak i rutynowych analiz próbek, w tym różnorodnych materiałów farmaceutycznych, chemicznych, przemysłowych czy biologicznych. Wykorzystując tę technikę można wykryć i oznaczyć niemal wszystkie substancje chemiczne.

Bezsprzecznie, każde z przeprowadzanych badań z wykorzystaniem analiz chromatograficznych obliguje do ustalenia najkorzystniejszych warunków separacji i identyfikacji badanych związków, co bezpośrednio wpływa na jakość otrzymanych wyników. Każda z nowo rozwijanych metod powinna spełniać określone kryteria walidacyjne, a także pozwalać na wykrywanie i identyfikację wybranych analitów na poziomie stężeń wymaganych dla danego zastosowania. Wymogiem stawianym analitykowi jest więc dobór jak najlepszych warunków, zarówno przygotowania próbki jak i separacji, podczas rozwijania nowej metody analitycznej.

Tematyka badań podjętych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej obejmuje zagadnienia mieszczące się na pograniczu chemii analitycznej i medycyny. Innowacyjny ich charakter przejawia się w opracowaniu nowych, niedrogich, minimalizujących negatywny wpływ na środowisko metod chromatograficznych, umożliwiających ocenę zawartości wybranych leków w materiale biologicznym z jednoczesną kontrolą kondycji układu wydalniczego człowieka. Celem pracy było zoptymalizowanie metod, które będą

mogły sprostać wymaganiom stawianym w praktyce medycznej i zostać wykorzystane do rutynowych analiz klinicznych. W szczególności skupiono się na opracowaniu nowych metod oznaczania TFV i ENT w próbkach biologicznych takich jak osocze, mocz i ślina.

### **12.1. Oznaczanie TFV w próbkach biologicznych**

Mając na względzie potencjalne nefrotoksyczne działanie TFV i jego analogów, przed rozpoczęciem leczenia, a także w trakcie trwania terapii tym lekiem, w pierwszym roku co 4 tygodnie, a w kolejnych latach co 3 miesiące, należy przeprowadzać ocenę stanu i pracy nerek [146]. Ze względu na dużą i indywidualną zmienność osobniczą stężeń TFV u różnych pacjentów leczonych tą samą dawką, zalecane jest monitorowanie jego poziomu w płynach ustrojowych [118]. Kluczowym aspektem terapii jest dostosowanie odpowiedniej dawki leku dla danego pacjenta. Oznaczane poziomy stężeń TFV w osoczu pozwalają na zobrazowanie jego działania w organizmie człowieka. Niedostateczny poziom leku, nie wykazuje aktywności przeciwwirusowej, co skutkuje uodpornieniem się wirusa. Utrzymujące się zbyt wysokie poziomy stężeń niebezpiecznie zwiększają prawdopodobieństwo wystąpienia toksyczności nerkowej [37,38]. Zatem monitorowanie zawartości TFV w płynach ustrojowych pacjentów jest wymagane zarówno w celu kontrolowania dawki terapeutycznej, jak i w odniesieniu do nadzoru nad prawidłowym funkcjonowaniem nerek [113].

W diagnostyce medycznej jednym z najczęściej stosowanych i powszechnie akceptowanych testów czynności nerek jest klirens kreatyniny [147]. Dodatkowo WHO zaleca częste monitorowanie stężeń leków przeciwwirusowych i czynności nerek u pacjentów z grupy zwiększonego ryzyka ich dysfunkcji [148]. Nie należy stosować TFV równocześnie z innymi lekami o działaniu nefrotoksycznym, a także bezpośrednio po zakończeniu terapii [146]. Jak opisano w części teoretycznej (podrozdział 2.2), TFV jest wydalany z organizmu człowieka w postaci niezmienionej, głównie poprzez aktywne wydzielanie kanalikowe, z tego powodu jego stężenie w moczu mogłoby stanowić użyteczny marker toksyczności kanalikowej związanej z zastosowaną dawką leku.

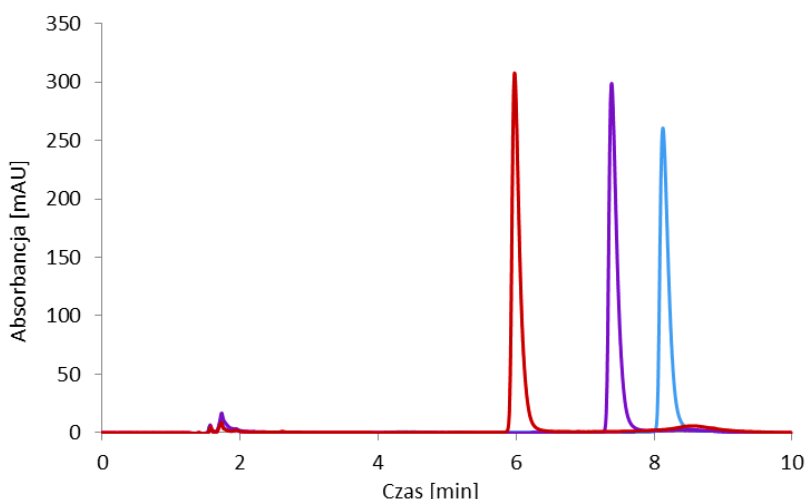
W przypadku osób zakażonych wirusami HIV i HBV, badanie poziomu leków w krwi obwodowej nie jest zalecane ponieważ, po pierwsze – procedura pobrania próbek krwi to dla niektórych pacjentów przeżycie traumatyczne, po drugie – zwiększa ryzyko dodatkowych zakażeń personelu medycznego ww. wirusami. Stosowanie próbek moczu zamiast próbek osocza do monitorowania zawartości leków przeciwwirusowych u osób

zakazonych, wydaje się być bardziej bezpiecznym i wysoce pożądanym społecznie. Wykorzystanie próbek moczu znacznie zmniejsza ryzyko przypadkowych infekcji związanych z transportem, przechowywaniem lub utylizacją próbek w porównaniu z próbkami osocza. Zastosowanie techniki HPLC sprzężonej z detekcją UV do oznaczania związków obecnych w płynach biologicznych stanowi korzystną alternatywę względem protokołów analitycznych wykorzystujących bardzo drogi sprzęt [28,33,113-116,118-125,127,128] oraz skomplikowane procedury przygotowania próbek do analizy [110-112,115,117,119].

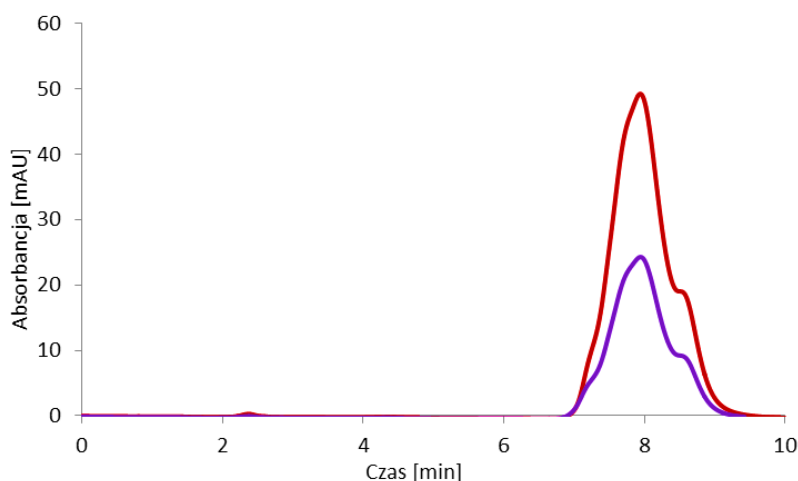
### ***Optymalizacja procedury jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach moczu***

Podchodząc do problemu badawczego związanego z opracowaniem całkiem nowej metodologii, z jednej strony postawiono na innowacyjność związaną z jednoczesnym oznaczaniem stężenia TFV i Crn w moczu, z drugiej zaś na jak największą prostotę wykonania całego protokołu. Były to dwa kluczowe aspekty, które umożliwiłyby komercyjne wykorzystanie metody w laboratoriach analitycznych i medycznych. Według raportu WHO jednym z obszarów geograficznych najbardziej dotkniętych wirusem HIV i HBV jest region afrykański, w którym w 2021 roku odnotowano prawie 60% nowych zakażeń wirusem HIV względem całego świata [148,149].

Jakość procesu separacji chromatograficznej uwarunkowana jest m.in. wyborem odpowiedniej kolumny, zatem w pierwszym etapie optymalizacji metody dokonano doboru odpowiedniej fazy stacjonarnej i ruchomej (podrozdział 7.1). Budowa strukturalna cząsteczek TFV i Crn sugeruje, że powinny one być dobrze rozdzielane i ulegać retencji na kolumnie typu HILIC w wyniku ich oddziaływań elektrostatycznych z krzemionką stanowiącą wypełnienie kolumny. Pomimo uzyskania symetrycznych i wąskich pików przeprowadzone eksperymenty wykluczyły zastosowanie kolumny HILIC z dalszego etapu optymalizacji metody. Główną przyczyną był brak powtarzalności czasów retencji sygnału pochodzącego od TFV w następujących po sobie analizach (Ryc. 68). Długoczasowe kondycjonowanie kolumny nie rozwiązało tego problemu. W eksperymencie zbadano również kolumnę C-18 typu Poroshell, na której uzyskano zniekształcone, rozdwojone sygnały TFV (Ryc. 69), co z chromatograficznego punktu widzenia wykluczyło jej zastosowanie. Ostatecznie do dalszych badań zdecydowano się wykorzystać kolumnę ZOBRAx SB-C18, co współgra z wcześniej opublikowanymi metodami oznaczania TFV w moczu [125,126], ślinie [128] i osoczu [28,33,112,114,115,117,122] w których były stosowane kolumny C-18.



**Ryc. 68.** Przykładowy wynik analizy standardu TFV dla kolumny Kinetex HILIC ( $100 \times 4,6$  mm,  $2,6 \mu\text{m}$ ). Pozostałe warunki HPLC: faza ruchoma PB ( $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  pH 2,7), MeCN, elucja gradientowa: 0-5 min 80-50% MeCN, 5-10 min 50-80% MeCN, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ .



**Ryc. 69.** Przykładowy wynik analizy standardu TFV dla kolumny Poroshell ( $75 \times 4,6$  mm,  $2,7 \mu\text{m}$ ). Pozostałe warunki HPLC: faza ruchoma MeOH, (PB  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  pH 6,8), elucja gradientowa: 0-5 min 8-15% MeOH, 5-10 min 15-8% MeOH, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ .

Kolejnym z etapów rozwijania metody była optymalizacja rozdzielania poprzez dobór odpowiedniej, dwuskładnikowej fazy ruchomej. Założenia pracy zdeterminowały użycie jak najmniejszej ilości toksycznych dla środowiska rozpuszczalników organicznych, dlatego zamiast wykorzystania w fazie ruchomej wyższego stężenia rozpuszczalnika o mniejszej sile elucyjnej – MeOH użyto bardzo niskiego stężenia MeCN. Koncepcja związana z separacją i detekcją dwóch składników tj. Crn i TFV



w jednym toku analizy, uniemożliwiły zastosowanie większej ilości rozpuszczalnika organicznego. Już przy początkowym stężeniu 3% MeCN obserwowano koelucję sygnału Crn z sygnałami pochodzącymi z matrycy. Skutkowało to brakiem możliwości identyfikacji pików Crn. Z tego powodu, całą analizę chromatograficzną zdecydowano się rozpocząć od 2% MeCN. Wiadomym jest, iż stosowanie niewielkich ilości modyfikatorów organicznych w fazie ruchomej podczas analiz na kolumnach z wypełnieniem C18 może wpływać niekorzystnie na jej złożość, jednak podczas prac eksperymentalnych nie zauważono spadku sprawności stosowanej kolumny. Założony cel został osiągnięty bowiem w dotychczas opublikowanych metodach dedykowanych oznaczaniu TFV w moczu zawartości MeCN w fazie ruchomej wahały się w przedziale 5-75% [125,126].

Przeprowadzone badania wstępne wykazały, iż PB jako wodny składnik fazy ruchomej wpływa najlepiej na jakość jednoczesnej separacji Crn i TFV. Dlatego też w dalszej części eksperymentów zoptymalizowano jego stężenie oraz wartość pH. Analizując otrzymane wyniki (Ryc. 9-11) stwierdzono, iż stężenie PB wpływa znacząco na pole powierzchni sygnału otrzymywanego dla TFV, z kolei wartość pH PB powoduje zmiany w czasie retencji analitu. Wzrost wartości pH z 7 do 7,4 doprowadził do skrócenia czasu elucji sygnału, zaś dalsze zwiększanie pH do 7,6 ponownie jego wydłużenie. W przypadku Crn zastosowanie PB w zakresie stężeń 0,01-0,05 mol l<sup>-1</sup> i pH 7-7,6 prowadziło do otrzymywania stabilnych, powtarzalnych wartości badanych parametrów. W dotychczasowych metodach oznaczania TFV w moczu stosowano 0,05% kwas mrówkowy [125] lub 0,1% kwas fosforowy(V) doprowadzony do pH 7 [126].

W przypadku metod chromatograficznych opartych na detekcji UV zastosowanie najodpowiedniejszych długości fal ma kluczowe znaczenie dla wykrywania analitu i czułości metody. Z tego powodu przeanalizowano zebrane widma UV zarówno dla Crn jak i TFV (Ryc. 8) i zdecydowano o zastosowaniu dwóch różnych długości fal w toku jednej analizy. Gradient detekcji wyglądał następująco: 234 nm od 0 do 3 min podczas detekcji sygnału Crn i 260 nm od 3 do 8 min do wykrywania TFV. Wybrane długości fal odpowiadają maksimum absorpcji dla każdego z analitów i są zgodne z danymi literaturowymi [33,112,126].

Przygotowanie próbki do analizy bardzo często jest najbardziej pracochłonnym i czasochłonnym etapem podczas wykonywania całej procedury analitycznej. Zastosowanie różnych technik, czy to ekstrakcyjnych, czy reakcji derywatyzacji, wymaga dodatkowego użycia odczynników, ale i także obarczone jest dużym ryzykiem

wystąpienia błędów. Opisane w literaturze protokoły analityczne wymagają stosowania większej objętości próbki moczu do analizy (tabela 25), a także bardziej skomplikowanych i czasochłonnych procedur jej przygotowania w porównaniu z opracowaną metodologią. Proces ten obejmuje zwykle więcej etapów przygotowania próbki: m.in. zakwaszenie oraz odwirowywanie [125], czy też odbiałczanie, sonikację, wirowanie i filtrowanie [126]. Wszystkie te etapy wydłużają całkowity czas przygotowania próbki od 10 do aż 35 min [125,126]. W porównaniu z czasem potrzebnym jedynie na jej rozcieńczenie (maksymalnie 1 min), generuje to bardzo duże różnice w odniesieniu do możliwości przygotowania jak największej liczby próbek w jednostce czasu.

Zaproponowana metodyka uwzględnia zarówno aspekty ekonomiczne jak i analityczne, a przygotowanie próbki moczu do analizy polega jedynie na jej rozcieńczeniu. Zużywanie dużej ilości jednorazowych probówek, końcówek, fiolek, wiąże się z dużymi wydatkami, dlatego też korzystanie ze szklanych fiolek wielorazowego użytku do przygotowania próbek jak i analizy oszczędza koszty wygenerowane podczas przeprowadzania analizy i minimalizuje ilość generowanych odpadów laboratoryjnych z tworzyw sztucznych. W celu sprawdzenia, czy ponowne ich wykorzystanie może spowodować wystąpienie efektu przeniesienia, przeprowadzono dodatkowy test. Używano tej samej fiołki do analizy roztworów wzorcowych i po jej umyciu do próbek ślepych. Eksperyment pozwolił na stwierdzenie, iż w czasach retencji odpowiadających analitom nie występują żadne sygnały.

**Tabela 25.** Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w moczu.

Parametry	Opracowana metoda [142]	[125]	[126]	[127]
Objętość próbki (ml)	0,05	0,1	0,5	0,1
Zakres liniowości ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	10-300	-	1-100	0,01-1
$R^2$	0,999	0,999	0,999	0,996
LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	4,0	0,19	0,14	0,005
LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	8,0	0,39	0,42	-
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	1,9-4,1	5,8-8,5	0,54	-
Precyzja między-dniowa (RSD%)	4,3-8,1	5,6-12,9	0,89	-

Optymalizacja nowej metodologii wymaga weryfikacji otrzymanych wyników poprzez procedurę walidacji. Procedurę walidacji oraz badanie trwałości analitów prowadzono na próbkach moczu wzbogaconych znanymi ilościami Crn i TFV. Sporządzone krzywe kalibracyjne, w oparciu o klasyczny model regresji liniowej, zarówno dla Crn, jak i TFV potwierdziły liniową zależność pól powierzchni pików od ich stężenia w moczu. Wyniki kalibracji zaprezentowano na Ryc. 16, 17 i w tabeli 8, zaś wartości dokładności i precyzji metody zestawiono w tabeli 9. Uzyskane wartości precyzji i dokładności spełniają wymagania stawiane przez Amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) metodom stosowanym w analizie próbek biologicznych [145]. Ponadto są zgodne z regułami podawanymi przez Międzynarodową Radę Harmonizacji Wymagań Technicznych dla Rejestracji Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi (ang. *International Council on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH) [150]. Porównując otrzymane wartości LOD i LOQ z danymi literaturowymi (tabela 25) można stwierdzić, iż są one zdecydowanie gorsze w porównaniu z wcześniej opracowanymi protokołami. Należy jednak wziąć pod uwagę realnie występujące wysokie stężenia obydwu związków w moczu.

Badana była również stabilność krótkoterminowa oraz odporność analitów na wielokrotne zamrażanie i rozmrażanie próbek moczu (podrozdział 7.3). Konieczność badań podyktowana była faktem, że tylko w jednej publikacji dotyczącej moczu wspomniano, że próbki mogą być przechowywane w  $-20^{\circ}\text{C}$  i rozmrażane nie więcej niż trzy razy [125]. Dane dotyczyły tylko TFV i nie uwzględniały jego trwałości w innych temperaturach. Stwierdzono, iż obydwa związki dla wybranych temperatur w czasie przebiegu eksperymentu pozostają stabilne (Ryc. 13), a test zamrażania i rozmrażania próbki udowodnił, iż proces ten wpływa na degradację TFV (Ryc. 14, 15).

Zoptymalizowaną procedurę wykorzystano do określenia zawartości TFV w próbkach moczu pochodzących osób poddanych terapii przeciwwirusowej. Dzięki zastosowaniu niniejszej metodyki, możliwe było nie tylko określenie stężenia leku w moczu, ale również jego znormalizowanie poprzez określenie zawartości Crn i przeliczenie ilości TFV z uwzględnieniem rozcieńczenia próbki (tabela 10). Wyznaczono profil farmakokinetyczny wydalania TFV w czasie 8 godzin od przyjęcia leku w dawce 123 mg (podrozdział 7.5). Wyniki doświadczeń laboratoryjnych uzyskane podczas tego eksperymentu wyraźnie wskazały, że w czasie badania, czyli do 8 h od

zażycia preparatu farmaceutycznego, największa ilość TFV była wydalana z moczem w ciągu 2-4 godzin po przyjęciu leku, a następnie stopniowo zmniejszała się do ósmej godziny (Ryc. 18). W literaturze światowej znaleźć można badania dotyczące oznaczania stężenia TFV w moczu przeprowadzone na dużych grupach kontrolnych. W żadnej z prac nie zamieszczono informacji na temat krótko czasowego wydalania TFV, tak więc niemożliwym jest porównanie pojedynczych wyników uzyskanych z zastosowaniem opracowanej metody z zamieszczonymi analizami statystycznymi. Doniesienia naukowe wskazują, iż TFV podany doustnie jest szybko wchłaniany (do ok. 1 h od podania), jego biodostępność wynosi zaledwie 25%, reszta wydalana jest z moczem w postaci niezmienionej. Ilość TFV wydalonego z moczem w ciągu 24 godzin od podania leku wynosi około 65% całkowitej ilości dostarczonego TFV, zwiększając się do 85% po 48 godzinach [151]. Ze względu na zmienność osobniczą metabolizmu leku, jak również dawki terapeutycznej, ilość TFV wydalanego z moczem u pacjentów różni się. Badania przeprowadzone przez Calango i wspóln. wykazały, że ilość wydalonego TFV po 24 h waha się w granicach 11-15,8 mg, zaś po 48 h - 14,1-24,1 mg [152]. W testach innych naukowców oznaczona zawartość TFV mieściła się w zakresie 0,453-43,576  $\mu\text{g ml}^{-1}$  [125]. Potwierdzone wysokie stężenia leku w moczu świadczą, iż zaprezentowana procedura może z powodzeniem zostać wykorzystania do rutynowych analiz. Niższa LOQ metodyki byłaby wymagana podczas analizy próbek ze związkami wykrywanymi na poziomie śladowym.

Z opublikowanych prac naukowych można dowiedzieć się o metodach wykorzystywanych w analizie chromatograficznej TFV w próbkach moczu [125-127], jednocześnie brak jest informacji o protokołach analitycznych dedykowanych do jednoczesnego oznaczania ilościowego TFV i Crn, co świadczy o nowatorstwie przeprowadzonych eksperymentów. Zaprezentowana metodyka jest bardziej skupiona na aspekcie aplikacyjnym - możliwości jednoczesnej identyfikacji i separacji Crn oraz TFV w krótkim czasie oraz generowaniu niewielkich kosztów analiz, niż osiągnięciu jak najniższych granic wykrywalności i oznaczalności.

### ***Optymalizacja procedury jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach osocza***

Konsekwentne przestrzeganie przyjmowania leków ma kluczowe znaczenie dla skuteczności terapii. Kontrola przestrzegania zasad profilaktyki leczenia przeciwwirusowego przez pacjentów, jest trudna dla pracowników służby zdrowia. Monitorowanie stężenia TFV w osoczu może być przydatne, jeśli podejrzewa się słabe przestrzeganie zaleceń lekarskich lub jeśli istnieje podejrzenie negatywnego wpływu

stosowanej dawki na czynność pracy nerek. Badania farmakokinetyczne oparte na danych dotyczących stężenia w osoczu mogą być wykorzystane jako pomoc w określeniu najlepszego schematu dawkowania dla każdego pacjenta. Ocena korelacji występującej między stężeniem TFV w osoczu i moczu jest pomocna w kontrolowaniu wchłaniania, dystrybucji, metabolizmu i wydalania TFV z organizmu [113,151].

Otrzymanie zadowalających wyników dla procedury jednoczesnego oznaczania Crn i TFV dla próbek moczu, poskutkowało podjęciem decyzji o próbie optymalizacji analogicznej metodyki na próbkach osocza. Do badań wykorzystano kolumnę ZORBAX SB C18 (rozdział 8). W kolejnych krokach zbadano wpływ stężenia i pH PB w fazie ruchomej na kształt i pole powierzchni sygnałów pochodzących od Crn i TFV w próbkach osocza wzbogaconego analitami. Na podstawie otrzymanych zależności (Ryc. 19-21) stwierdzono, że stężenie PB nie wpływa znacząco na wielkość pola powierzchni sygnału Crn w badanym zakresie i pozwala osiągnąć największe sygnały dla TFV przy stężeniu PB wynoszącym  $0,015 \text{ mol l}^{-1}$ . Zmiana pH PB nie różnicuje analizowanych parametrów w przypadku Crn. Dla TFV, podobnie jak w poprzedniej metodzie największy sygnał o najkrótszym czasie retencji otrzymano dla pH 7,4. W dotychczasowych metodach oznaczania TFV w osoczu przy wykorzystaniu odwróconego układu faz stosowano mieszaniny fosforanów w zakresie pH 5,7-7 [110-112] tak jak w opracowanej przeze mnie metodzie. Innymi składnikami wchodzącymi do fazy ruchomej były octan amonu o pH 2,5-6,89 [28,33,114,123], 1% kwas octowy [113,116], kwas mrówkowy w zakresie stężeń 0,05-1% [115,118,120,121] i mrówczan amonu o pH 2,5 [124].

Sprawdzono również wpływ stężenia MeCN w fazie ruchomej, na jakość separacji i identyfikacji obydwu analitów. Zauważono, że zwiększenie zawartości procentowej MeCN w mieszaninie elucyjnej, podobnie jak w przypadku próbek moczu, nie wpływało znacząco na jakość sygnału pochodzącego od TFV. Jednocześnie powodowało ono koelucję sygnału Crn z innymi składnikami matrycy. Ostatecznie zdecydowano więc o przeprowadzaniu analiz przy użyciu 2% MeCN z wykorzystaniem izokratycznego trybu elucji. W literaturze opisanych jest kilka metod oznaczania TFV w osoczu w odwróconym układzie faz, gdzie stosuje się niskie stężenia (1-3%) MeCN w fazie ruchomej [110,113,115,116] lub 1,5-5% MeOH [33,112].

Kolejnym etapem przeprowadzonych badań było wyznaczenie optymalnej metody usunięcia białek z próbek osocza. Proces ten jest kluczowym etapem w wielu przypadkach analizy chemicznej płynów ustrojowych. Matrycę białkową można usunąć z próbek biologicznych, stosując różne procedury, fizyczne, np. ogrzewanie, filtracja, czy

chemiczne, np. poprzez dodanie różnorodnych kwasów, soli, związków organicznych, lub ich mieszanin [153]. Ultrafiltracja jest procesem konwekcyjnym wykorzystującym półprzepuszczalne membrany do oddzielenia makrocząsteczek, opierającym się na mechanicznej separacji białek w zależności od ich wielkości. W badaniach wstępnych wykorzystano specjalne filtry membranowe, na które nanoszono próbki osocza wzbogacone roztworem TFV (podrozdział 8.2). Niestety, przy zastosowaniu filtrów membranowych otrzymano niepowtarzalne wyniki analiz, a rozrzuty pomiędzy wartościami TFV dla tego samego stężenia w osoczu były bardzo duże. Przyczyną tego może być strata analitów poprzez ich wiązanie z białkami i niska wydajność procesu odbiałczania, związana z zapychaniem mikroporów filtra [154]. Z tego względu w kolejnym kroku zdecydowano się zastosować kwas chlorowy(VII) - PCA, który obecnie jest dedykowany i najczęściej wykorzystywany w procesie deproteinizacji [153]. Użycie niewielkiej objętości (50  $\mu$ l), umożliwiło wytrącenie białek z próbek osocza, a także uzyskanie najlepszych parametrów ilościowych (Ryc. 22). W dotychczasowych metodach oznaczania TFV w osoczu jako czynniki deproteinizujące stosowano MeOH [111], MeCN [128], kwas trichlorooctowy [110,117], kwas trifluorooctowy [113]. W kilku pracach proces odbiałczania był połączony z ekstrakcją do fazy stałej (SPE), gdzie na kolumnienki wprowadzano rozcieńczone próbki osocza [28,33,112,115]. Spośród proponowanych sposobów usuwania białka dodatek PCA wydaje się być najbardziej efektywny z uwagi na małą objętość dodawanego odczynnika, małe rozcieńczenie próbki i natychmiastowe działanie.

Sprawdzono stabilność badanych związków w próbkach osocza z dodatkiem wzorca TFV (Ryc. 23), a także wpływ cyklu zamrażania i rozmrażania próbek na proces degradacji analitów (Ryc. 24 i 25). Otrzymane wyniki wskazują, iż zarówno Crn jak i TFV pozostają stabilne w próbkach osocza inkubowanych w 4 i 37°C w czasie 5 h, co wpisuje się w dostępne dane literaturowe. Wcześniej wykonane badania wykazały, że TFV obecny w osoczu jest trwały w temperaturze pokojowej od 10 to 72 h [28,110,113,119]. Badania cyklu zamrażania i rozmrażania udowadniają, iż spadek stężenia TFV na akceptowalnym poziomie (15%) obserwuje się do trzech cykli zamrażania-rozmrażania, co jest zgodne z wcześniej opublikowanymi wynikami [110,117]. W danych literaturowych można również znaleźć informacje, że próbki osocza z TFV są stabilne do czterech [28] a nawet sześciu [119] cykli zamrażania i rozmrażania, czego moje badania nie potwierdziły.

Istotnym elementem podczas rozwijania każdej nowej metody analitycznej jest przeprowadzenie procesu walidacji, który udowadnia, czy dana metoda stosowana do ilościowego pomiaru analitów jest wiarygodna i powtarzalna. Określono zakresy liniowości Crn i TFV w osoczu, a krzywe kalibracji uzyskano poprzez wykreślenie zależności powierzchni pików w funkcji stężeń analitów (podrozdział 8.4). Równania regresji i współczynniki korelacji (0,9999 dla TFV i 0,9998 dla Crn) przedstawiono w tabeli 11. Wyznaczone dokładność i precyzja wewnątrz- oraz między-dniowa (tabela 12) wskazują, że wartości te nie przekraczają  $\pm 10\%$  i  $6\%$  odpowiednio w przypadku dokładności i precyzji. Uzyskane wartości spełniają wymagania FDA oraz ICH stawiane metodom dedykowanym do oznaczania leków w próbkach biologicznych [145,150].

Tylko w kilku pracach badawczych metodyka oznaczania TFV w próbkach osocza oparta jest na wykorzystaniu techniki HPLC sprzężonej z detekcją UV [33,112,117]. Zdecydowana większość prac badawczych wykorzystuje spektrometrię mas do detekcji analitu [28,33,113-116,118-124]. W odniesieniu do literatury fachowej, nowo opracowana metoda jest pierwszą, która umożliwia oznaczenie Crn i TFV w osoczu w jednym cyklu analitycznym. W tabeli 26 zestawiono metodyki wykorzystujące detekcję UV do oznaczania TFV w osoczu. Wyznaczone granice wykrywalności i oznaczalności w opisanej pracy wyniosły  $0,15 \mu\text{g ml}^{-1}$  i  $0,2 \mu\text{g ml}^{-1}$  osocza dla TFV i  $0,0003 \mu\text{mol ml}^{-1}$  i  $0,001 \mu\text{mol ml}^{-1}$  osocza dla Crn. Jak można zauważyć uzyskane wartości są dużo gorsze od opisanych w literaturze metod odnoszących się do TFV.

**Tabela 26.** Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w osoczu.

Parametry	Opracowana metoda [142]	[33]	[112]	[117]
Objętość próbki (ml)	0,05	1,0	0,2	0,3
Zakres liniowości ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,5-5	0,01-4	0,02-10	0,01-5
$R^2$	0,999	-	0,999	0,999
LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,15	0,003	0,02	-
LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,5	0,01	0,06	0,008
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	3,7-4,7	3,3-5,9	1,7-3,7	2,4-9,6
Precyzja między-dniowa (RSD%)	3,6-5,6	2,7-8,6	3,7-5,2	5,4-9,3

Analizując wybrane parametry można stwierdzić, iż w uprzednio opublikowanych raportach wykorzystywano duże objętości osocza, które wahały się w granicach od 200 nawet do 1000  $\mu\text{l}$ . W każdym z powyższych protokołów [33,112,117], przygotowanie próbki do analizy opierało się na metodzie SPE, która jest bardziej kosztowna i czasochłonna, wymaga zużycia większej ilości odczynników chemicznych oraz sprzętu jednorazowego użytku w porównaniu z zaproponowaną procedurą. Uzyskane w mojej pracy wysokie wartości LOD i LOQ w porównaniu z wcześniej opisanymi protokołami, ograniczają rutynową kontrolę stężenia TFV w osoczu. Wartości stężeń TFV opisane w literaturze oscylują w granicach 0,013-3,3  $\mu\text{g ml}^{-1}$  [33,111,113,115]. Ekspozycja TFV w osoczu jest wyznacznikiem toksyczności dla nerek w stężeniu powyżej 0,16  $\mu\text{g ml}^{-1}$  [152]. Jest to wartość oscylująca na granicy wykrywalności zaproponowanej procedury. Brak możliwości ilościowego oznaczenia tak niskich stężeń, umożliwia jedynie oszacowanie, czy potencjalnie toksyczna dawka leku została skumulowana w osoczu pacjenta.

#### ***Optymalizacja procedury oznaczania TFV w ślinie***

Jedną z głównych korzyści posługiwania się śliną jako narzędziem diagnostycznym jest to, że pobieranie próbek jest wygodne i nieinwazyjne. Radykalnie zmniejsza to dyskomfort z jakim związane jest pobranie krwi oraz nie ingeruje w kwestie prywatności badanego, jak w przypadku oddawania próbki moczu. Nieinwazyjne podejście do pobierania materiału badawczego może zwiększyć chęć poddawania się rutynowym badaniom lekarskim. Pozytywne aspekty wykorzystania śliny jako materiału diagnostycznego mogą znacznie zwiększyć częstość monitorowania ogólnego stanu zdrowia czy diagnozowania chorób [95].

Innowacyjne podejście świata medycznego w kwestii przenoszenia wirusa HIV obejmuje stosowanie leków jako narzędzi zapobiegawczych w postaci tabletek doustnych, zawierających aktywny środek przeciwwirusowy [155]. Stosunek oralny niesie ze sobą znacznie mniejsze ryzyko zakażenia HIV, jednak pozostaje niezależnym czynnikiem ryzyka przeniesienia wirusa. Niebezpieczeństwo to wzrasta wraz z częstotliwością aktywności seksualnej, obecnością owrzodzeń czy zapalenia jamy ustnej i gardła. Aby terapia wykazywała działanie prewencyjne, leki przeciwwirusowe powinny być przyjmowane doustnie, a ich stężenie w ślinie wystarczające do zahamowania replikacji wirusa. Wiele czynników wpływa na dystrybucję leków w ślinie m.in. ich wiązanie z białkami, rozpuszczalność w wodzie, czy tłuszczach, a także wartość pH śliny. Z badań przeprowadzonych przez francuskich badaczy Oddziału Chorób Zakaźnych,



Szpitala Saint-Louis (Paryż, Francja), wynika, iż dystrybucja TFV w ślinie jest stosunkowo słaba i może być niewystarczająca do zahamowania replikacji wirusa [155]. Do tej pory w literaturze obecna jest tylko jedna publikacja [128] dotycząca oznaczania TFV w ślinie, z tego powodu dalsze badania w tym zakresie wydają się być zasadne.

W toku badań sprawdzono, czy warunki chromatograficzne oznaczania TFV w osoczu, mogą być zaadaptowane do badania próbek śliny (rozdział 9). Wykonane eksperymenty potwierdziły, że wystarczy jedynie niewielka modyfikacja w procentowej zawartości MeCN (z 2 do 3%). Takie postępowanie pozwoliło na skrócenie czasu analizy, a także otrzymanie lepiej wykształconego sygnału analitycznego. Dalsze zwiększanie ilości modyfikatora organicznego powodowało koelucję piku TFV z sygnałami pochodzącymi od matrycy. Zbadano również efektywność odbiałczenia śliny za pomocą  $3 \text{ mol l}^{-1}$  PCA. Przeprowadzone eksperymenty nie wykazały istotnej zależności pomiędzy zastosowaną objętością PCA, a polem powierzchni piku (Ryc. 29). Z uwagi na ograniczone informacje na temat stabilności TFV w ślinie sprawdzono zarówno trwałość analitu w ślinie jak i wpływ zakwaszenia na stabilność TFV w temperaturach 36,6, 25, 4 i  $-20^{\circ}\text{C}$  w czasie 5 godzin (Ryc.30). Eksperymenty pokazały, że TFV w ślinie i kwaśnym supernatancie pozostaje stabilny przez 4 godziny w temperaturze w temperaturach  $4^{\circ}\text{C}$  i 3 godziny w temperaturach w temperaturach 36,6 i  $25^{\circ}\text{C}$ . Wyniki nie są spójne z danymi literaturowymi [128], które wskazują na 6 godzinną trwałość w ślinie przechowywanej w temperaturze pokojowej i w acetonitrylowym supernatancie utrzymanym w  $4^{\circ}\text{C}$ . Następnie sprawdzono wpływ cyklu zamrażania i rozmrażania śliny na stopień rozkładu TFV (Ryc. 31). Przeprowadzone badania wykazały, iż akceptowalne przez FDA i ICH wyniki degradacji TFV ( $\pm 15\%$ ) otrzymywano po 4 cyklach zamrażania-rozmrażania. Literatura wskazuje, że TFV jest stabilny do 3 cykli zamrożenia i rozmrożenia śliny, ale w innych warunkach temperaturowych [128], stąd trudne jest bezpośrednie zestawienie danych.

Otrzymaną metodę poddano walidacji (podrozdział 9.4). Wybrane parametry zaprezentowano w tabelach 13 i 14 oraz na rycinie 32. Potwierdzają one, że spełnione są wymagania FDA oraz ICH stawiane metodom dedykowanym do oznaczania leków w próbkach biologicznych [145,150]. Porównanie wybranych parametrów walidacji zamieszczono w tabeli 27. Z uwagi na zróżnicowany sposób detekcji nie można oczekiwać podobieństwa w wartościach LOD i LOQ. Należy jednak podkreślić, iż zaproponowana metoda oznaczania TFV wykorzystująca detekcję UV jest znacznie bardziej konkurencyjna ze względów ekonomicznych, wykorzystuje do badań mniejszą

objętość próbki i może zostać zastosowana w laboratoriach niewyposażonych w spektrometr mas.

**Tabela 27.** Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w ślinie.

Parametry	Opracowana metoda	[128]
Objętość próbki (ml)	0,1	2-3
Zakres liniowości ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,75-200	0,001-10
$R^2$	0,999	0,999
LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,01	-
LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,015	0,001
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	1,1-4,6	5,5-9,9
Precyzja między-dniowa (RSD%)	1,5-7,2	4,1-9,4

Zoptymalizowaną metodę z powodzeniem wykorzystano do analizy zawartości TFV w próbce śliny pacjenta i oznaczono go na poziomie  $0,24 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Przedstawione w pracy wyniki potwierdzają, że proponowane metodyki nadają się do badań zależności między stężeniem leku w moczu, osoczu i ślinie.

## 12.2. Oznaczanie ENT w próbkach biologicznych

Kliniczne badania farmakokinetyczne wykazały, że ENT jest szybko wchłaniany i osiąga maksymalne stężenie po ok. 0,5–1,5 h od zażycia preparatu farmaceutycznego [156]. Jego biodostępność jest znacznie wyższa niż dla TFV i wynosi powyżej 70%. ENT jest wydalany głównie z moczem w wyniku przesączania kłębuszkowego i wydzielania kanalikowego, a upośledzenie funkcji nerek zmniejsza klirens przyjmowanego leku [58]. Problematiczne jest również dobranie dawki stosowanego leku. Przyczyny niepowodzenia terapii mogą być związane ze zbyt niskim stężeniem ENT w organizmie, nieprzestrzeganiem zasad terapii dedykowanych w leczeniu HBV lub niestosowaniem się do zaleceń lekarskich [156]. Dostarczenie narzędzi analitycznych umożliwiających rutynową kontrolę zawartości ENT w płynach biologicznych, może pomóc w monitoringu stosowanej terapii.

### ***Optymalizacja procedury jednoczesnego oznaczania ENT i Crn w moczu***

Podobnie jak w przypadku rozwijania metodologii oznaczania TFV w próbkach biologicznych, w pierwszym etapie określono analityczną długość fali ENT, która wynosi 254 nm (Ryc. 34). Wartość ta odpowiada danym przedstawianym w publikacjach dotyczących metod oznaczania ENT w preparatach farmaceutycznych opartych na detekcji UV [130,134,138,139,141]. Jedynie w pracy z 2017 roku [140] dotyczącej oceny zawartości ENT w osoczu wskazano 218 nm, jako analityczną długość fali. Przy tej długości fali więcej związków chemicznych absorbuje promieniowanie UV, co może zaburzać proces analityczny. Jednoczesna, optymalna analiza dwóch składników, tj. Crn i ENT możliwa była dzięki zastosowaniu gradientu długości fali (podrozdział 10.1.).

W następnym kroku dokonano wyboru optymalnych warunków chromatograficznych, które zezwalały na separację Crn i ENT. W badaniach pilotażowych, prowadzonych na próbce standardów wykorzystano kolumnę ZORBAX SB C18. Niestety, problem związany z identyfikacją sygnału ENT pojawił się w momencie przeprowadzenia analiz próbek rzeczywistych, polegający na koelucji sygnału pochodzącego z matrycy z sygnałem standardu analitu. W celu odseparowania pików tła od oznaczanego związku, zastosowano inne kolumny chromatograficzne (podrozdział 10.1.). Dopiero wybór kolumny Lichrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 μm) umożliwił dalsze rozwijanie metody. W tym procesie sprawdzono takie parametry jak: objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej (Ryc. 35), stężenie i pH PB (Ryc. 36-39) i stężenie MeCN w fazie ruchomej. Uzyskane optymalne warunki rozdzielania obrazuje chromatogram przedstawiony na rycinie 42. Jak można zaobserwować przy zastosowaniu kolumny LiChrosorb RP-18, elucji gradientowej (0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN, 7-10 min 4% MeCN), PB (0,01 mol l<sup>-1</sup>, pH 7,8), temperatury kolumny 25°C i objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej 1,5 ml min<sup>-1</sup> czasy retencji Crn i ENT wynosi odpowiednio 2,5 i 6 min. Na etapie rozwijania metodyki w literaturze dostępna była tylko jedna publikacja opisująca oznaczanie ENT w moczu szczura [133]. Wykorzystuje ona separację na kolumnie typu HILIC i detekcję za pomocą spektrometru mas. Z uwagi na różnicę w sposobie elucji kłopotliwe jest bezpośrednie porównanie metod.

Przygotowanie próbki do analizy polegało jedynie na jej rozcieńczeniu buforem, będącym składnikiem fazy ruchomej. Zaledwie 4-krotne rozcieńczenie umożliwiło jednoczesne oznaczenie Crn i ENT oraz nie powodowało przeładowania kolumny i spadku jej sprawności. Stosowana w pracy procedura jest bardzo prosta

w porównaniu z wcześniej opublikowaną [133], która na etapie przygotowania próbki stosuje SPE. Atutem opracowanej metodyki jest również 10-krotnie mniejsze zużycie próbki do analiz w stosunku metody HILIC-MS/MS.

Walidację metody przeprowadzono na próbkach moczu dla obydwu analitów. Dla każdego wyznaczono zakresy liniowości stosowanej metodyki, sporządzono krzywe kalibracyjne (Ryc. 40,41, tabela 15), wyznaczono wewnątrz- i między-dniową precyzję i dokładność (tabela 16). Uzyskane parametry są zgodne z wymaganiami FDA oraz ICH stawianymi metodom dedykowanym do oznaczania leków w próbkach biologicznych [145,150]. Wyznaczone LOD i LOQ metody, wynosiły odpowiednio 0,5 i 2,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  moczu dla ENT oraz 0,008 i 0,05  $\mu\text{mol ml}^{-1}$  moczu dla Crn. Z uwagi na różnicę w sposobie detekcji pomiędzy metodami, prezentowaną w pracy i opublikowaną w 2012 roku [133], oczywistym jest, że opracowana metoda ma dużo gorsze wartości LOD i LOQ. Innowacyjność metody polega na jednoczesnej identyfikacji Crn i ENT w próbkach moczu, bardzo prostej procedurze przygotowania próbki do analizy, przy wykorzystaniu techniki HPLC z detekcją UV.

#### ***Optimalizacja procedury jednoczesnego oznaczania ENT i Crn w osoczu***

Ocena stanu wiedzy na temat oznaczania ENT w osoczu z wykorzystaniem techniki HPLC wykazała, że najczęściej stosowanym detektorem jest spektrometr mas [129,131,132,135,137], a tylko jedna metoda opiera się na detekcji UV [140]. Prace wykorzystujące detektory UV, dedykowane są głównie analizom próbek farmaceutyków [130,134,138-141]. Stanowiło to podstawę podjęcia badań w kierunku jednoczesnego oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza w użyciu detekcji UV (podrozdział 10.2.). Zadowalające wyniki optymalizacji procedury dla próbek moczu stanowiły podstawę zbadania możliwości przeniesienia warunków chromatograficznych dla próbek osocza.

Optimalizacja parametrów chromatograficznych z wykorzystaniem wcześniej dobranej kolumny LiChrosorb RP-18 obejmowała zbadanie wpływu stężenia i pH PB (Ryc. 43-46) oraz stężenia MeCN na jakość separacji. Stosując elucję gradientową o profilu: 0-2 min 3-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN i 4-7 min 8-3% MeCN oraz PB o stężeniu 0,01 mol  $\text{l}^{-1}$  i pH 7,8, temperaturę kolumny 25°C i objętościową prędkość przepływu fazy ruchomej 1,5 ml  $\text{min}^{-1}$  uzyskano zadowalające efekty rozdzielania (Ryc. 50). W większości opublikowanych dotąd metod do oznaczania ENT w osoczu stosowano kolumny z wypełnieniem C-18 [129,131,132,140]. Można również znaleźć prace wykorzystujące separację w układzie HILIC [135,137]. Jako wodny składnik fazy ruchomej stosowano węglany [131], kwas octowy [132], octan amonu [135], kwas

mrówkowy [137] i bufor fosforanowy [140]. Proponowanym modyfikatorem organicznym oprócz MeCN [132,135,140] był MeOH [129,131,137]. Zaletą opracowanej metody jest niskie zużycie MeCN podczas analiz w stosunku do metody HPLC-UV z 2017 r. [140].

W procedurze przygotowania próbki do analizy uwagę skupiono na wyznaczeniu optymalnej objętości odczynnika umożliwi wytrącenie białka. Na rycinie 47 przedstawiono zależności otrzymanych pól powierzchni pików Crn i ENT od objętości zastosowanego PCA o stężeniu 3 mol l<sup>-1</sup>. W pracy Ashraf i współ. [140] jako czynnik odbiałczający zastosowano 5% TCA i filtrację na membranach. Zastosowanie w prezentowanej metodzie większej objętości PCA umożliwiło pominięcie etapu filtracji. Dodatkową zaletą tej metody jest użycie mniejszej objętości osocza (50 µl, względem 500 µl).

Wybrane parametry walidacji opracowanej metody zebrano w tabelach 17 i 18, a krzywe kalibracyjne przedstawiono na rycinach 48 i 49. Wyznaczone wewnątrz- i między-dniowe precyzja i dokładność są zgodne z wymaganiami FDA oraz ICH stawianymi metodom dedykowanym do oznaczania leków w próbkach biologicznych [145,150]. LOD i LOQ w badanej matrycy wyniosły 0,24 i 0,4 µg ml<sup>-1</sup> osocza dla ENT, zaś dla Crn 0,0004 i 0,001 µmol ml<sup>-1</sup> osocza. W przypadku ENT uzyskana wartość LOQ jest 10 krotnie wyższa w stosunku do opublikowanej metody HPLC-UV [140]. Wybrane parametry walidacji w porównaniu z zaprezentowaną metodą zestawiono w tabeli 28.

**Tabela 28.** Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT w próbkach osocza.

Parametry	Zaproponowana metoda	[140]
Objętość próbki (ml)	0,05	0,5
Zakres liniowości (µg ml <sup>-1</sup> )	0,4-8	0,039-100
R <sup>2</sup>	0,999	0,998
LOD (µg ml <sup>-1</sup> )	0,24	0,0097
LOQ (µg ml <sup>-1</sup> )	0,4	0,039
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	2,8-9,2	0,69-2,04
Precyzja między-dniowa (RSD%)	4,1-9,9	0,9-1,9

Porównując wybrane parametry można stwierdzić, iż opracowana metoda charakteryzuje się gorszymi wartościami LOD i LOQ, niższą czułością, a także mniejszym zakresem liniowości. Należy jednak podkreślić, iż optymalne parametry rozdzielania umożliwiają detekcję dwóch analitów jednocześnie. Dodatkowo, etap przygotowania próbki do analizy opiera się jedynie na jej rozcieńczeniu i deprotenizacji, a w porównywanej pracy składa się on z kilku kolejno wykonywanych czynności, w których większą ilość próbki biologicznej (500 µl) wstępnie mieszano i poddawano działaniu ultradźwięków, odbiałczano i odwirowywano, a w ostatnim etapie filtrowano. Cały proces przygotowania próbki do analizy wynosi ok. 20 minut, więc dwa razy dłużej niż w przypadku zaprezentowanej metody.

Innowacyjność metody polegająca na jednoczesnej detekcji Crn i ENT, może stanowić alternatywę do wykorzystania jej w badaniach klinicznych, w porównaniu z uprzednio opracowanym protokołem.

#### ***Adaptacja warunków separacji do oznaczania ENT w ślinie***

Brak danych dotyczących metod chromatograficznych wykorzystywanych do oznaczania ENT w próbkach śliny był czynnikiem decydującym o zaadaptowaniu uprzednio opracowanej metody dedykowanej osoczu. Niewielka modyfikacja gradientu fazy ruchomej umożliwiła skrócenie czasu analizy, a także poprawę jakości uzyskiwanego sygnału ENT (podrozdział 10.3.). Na rycinie 51 zaprezentowane wpływ 3 mol l<sup>-1</sup> PCA na jakość sygnału analitycznego. Z badań wynika, że 30 µl czynnika deproteinizującego umożliwia pełne wytrącenie białka i nie wpływa na zmianę sygnału ENT. Przeprowadzono proces walidacji metody, dla której wyznaczono zakres liniowej odpowiedzi detektora, sporządzono krzywą kalibracyjną w funkcji stężenia ENT (Ryc. 52), wyznaczono parametry RSD oraz odzysku (tabela 19), a także wartości precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej (tabela 20). Wyznaczono LOD i LOQ, które wynosiły odpowiednio 0,08 i 0,16 µg ml<sup>-1</sup> śliny i były one niższe w porównaniu z próbkami osocza.

#### ***Opracowanie metody oznaczania ENT w moczu z wykorzystaniem detekcji FLD***

Spektrofluorymetria w porównaniu z spektrofotometrią jest bardziej czułą i selektywną techniką detekcji, wykorzystywaną w metodach separacyjnych. Istnieją cząsteczki, które posiadają naturalne zdolności do fluorescencji, bądź takie, które można poddać upochodnieniu w celu nadania im wymaganych właściwości. Metody wykorzystujące detekcję FLD charakteryzują się większą selektywnością wobec badanych związków i znacznie lepszą czułością, umożliwiając osiągnięcie niższych granic

wykrywalności i oznaczalności [157]. Należy podkreślić, iż do tej pory nie opublikowano prac badawczych przedstawiających wykorzystanie techniki HPLC-FLD w oznaczaniu ENT.

### ***Optymalizacja metodyki oznaczania ENT w moczu***

W pierwszym kroku zarejestrowano widma wzbudzenia i emisji ENT (Ryc. 54) w celu określenia położenia maksimum fluorescencji (podrozdział 11.1). Na tej podstawie określono optymalne długości fal wzbudzenia (254 nm) i emisji analitu (380 nm). Następnie zoptymalizowano warunki chromatograficzne, dobrano odpowiednią fazę stacjonarną i ruchomą. Spośród dostępnych w laboratorium kolumn wybrano PolymerX z uwagi na bardzo szerokie spektrum wartości pH. Badania wstępne przeprowadzone na roztworach standardu ENT wykazały, iż zastosowanie silnie kwaśnej fazy ruchomej wpływa korzystnie na jakość sygnału ENT, z tego powodu przebadano takie kwasy jak octowy (Ryc. 55), TCA (Ryc. 56) i solny (Ryc. 57). Na podstawie otrzymanych wyników przeanalizowano wpływ rodzaju, stężenia kwasu i korelującego z nim pH, na jakość otrzymanego piku jak i czas retencji sygnału ENT. TCA okazał się najlepszym dodatkiem do wodnego składnika fazy ruchomej. W badanym zakresie stężeń zastosowanie TCA spowodowało zmiany w wartościach pól powierzchni sygnałów na poziomie 7% i zaobserwowano znaczący wpływ pH na czas retencji ENT. Wraz ze wzrostem stężenia i zmniejszeniem pH fazy ruchomej obserwowano skrócenie czasu elucji piku do 6 min.

W kolejnym etapie zbadano wpływ stężenia modyfikatora organicznego w fazie ruchomej. Mniejsza liczba sygnałów pochodzących od matrycy przy detekcji FLD umożliwiła zastosowanie elucji izokratycznej dla próbek moczu. Dzięki temu wyeliminowano dodatkowy czas potrzebny na rekondycjonowanie kolumny. Zastosowanie MeCN w fazie ruchomej powodowało interferowanie piku ENT z sygnałem tła. Z tego powodu zastosowano MeOH jako rozpuszczalnik o mniejszej sile elucyjnej. Umożliwiło to ich całkowite odseparowanie.

Większa specyficzność i selektywność wykorzystanego detektora, w połączeniu z naturalną zdolnością do fluorescencji ENT, pozwoliły na zastosowanie jedynie rozcieńczenia próbki moczu, na etapie przygotowania jej do analizy. W efekcie 4-krotne rozcieńczenie moczu spowodowało otrzymanie zadowalających wyników. Większe rozcieńczenia wpływały na uzyskanie gorszych stosunków sygnału do szumu linii podstawowej, a tym samym niekorzystnie na ocenę LOD i LOQ. W kolejnym kroku sprawdzono stabilność ENT w próbkach moczu o różnym pH (5, 6, 7) w czasie 300 minut, dla czterech różnych temperatur (Ryc. 58). Uzyskane wyniki wykazały, iż środowisko

i temperatura nie mają bezpośredniego wpływu na rozkład ENT w badanym przedziale czasowym. Test zamrażania i rozmrażania udowodnił, iż proces ten negatywnie wpływa na trwałość analitu w próbkach moczu (Ryc. 59). Spadek stężenia ENT na akceptowalnym poziomie (15%) obserwuje się do dwóch cykli zamrażania-rozmrażania.

W procesie walidacji metody określono zakres jej liniowości, wyznaczono dokładność i precyzję wewnątrz- i między-dniową, a także LOD i LOQ. Otrzymane wyniki walidacji metody wyznaczone dla ENT w próbkach moczu przedstawiono w tabelach 21 i 22 oraz na rycinie 60. Ze względu na brak doniesień literaturowych związanych z wykorzystaniem detekcji spektrofluorymetrycznej do oznaczania ENT w moczu, dla porównania otrzymanych wyników walidacji, w tabeli 29 zestawiono wartości wybranych parametrów uzyskanych dla uprzednio opracowanej metodyki wykorzystującej detektor UV.

**Tabela 29.** Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT opracowanych dla dwóch różnych sposobów detekcji.

Parametry	Detekcja UV	Detekcja FLD
Zakres liniowości ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	10-200	0,32-40
$R^2$	0,999	0,999
LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,5	0,12
LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	2,5	0,32
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	1,3-2,5	1,3-3,8
Precyzja między-dniowa (RSD%)	4,8-7,1	2,7-7,2

Zastąpienie w metodologii detekcji UV, detekcją FLD, umożliwiło znaczne obniżenie LOD i LOQ ENT w próbkach moczu. Miało również wpływ na zwiększenie zakresu liniowości metody. Średnie wartości precyzji wewnątrz- i między-dniowych w obydwu przypadkach są bardzo zbliżone. Podsumowując, można pokusić się o stwierdzenie, że metoda opracowana z wykorzystaniem detekcji FLD powinna być bardziej preferowana i wykorzystywana w rutynowych badaniach analitycznych.

#### ***Rozwinięcie metody separacji i identyfikacji ENT w próbkach osocza i śliny***

Zadowalające wyniki uzyskane podczas rozwijania chromatograficznej metody oznaczania ENT w próbkach moczu były podstawą zaadaptowania warunków



rozdzielenia dla próbek osocza i śliny (podrozdział 11.2). Przeprowadzone badania wykazały, iż zarówno w przypadku osocza jak i śliny na otrzymanych chromatogramach obserwuje się niewielką liczbę sygnałów pochodzących z tła próbki (Ryc. 62,63). Dlatego też, zdecydowano o zastosowaniu kwasu solnego jako wodnego składnika fazy ruchomej, dzięki któremu można było znacząco skrócić czas analizy, nie zwiększając zużycia ilości modyfikatora organicznego. Założenia eksperymentów związane z wykorzystaniem tych samych warunków chromatograficznych dla śliny i osocza, spowodowały wprowadzenie zmian w sposobie elucji i składzie fazy ruchomej.

W dalszym etapie badań należało dobrać optymalną ilość 3 mol l<sup>-1</sup> PCA do procesu deprotenizacji próbek śliny i osocza. Na rycinie 64 zestawiono zależności pól powierzchni sygnałów ENT w funkcji objętości zastosowanego PCA. Eksperyment wykazał, iż zastosowanie 20 µl czynnika strącającego powoduje optymalne usunięcie białka z próbki. Przeprowadzono test stabilności ENT w próbkach osocza i jego supernatantu w czterech różnych temperaturach w czasie 5 godzin (Ryc. 65). Eksperyment wykazał, iż ENT w próbkach supernatantu osocza dla temperatury 36,6°C i -20°C pozostaje bardziej stabilny, w porównaniu z próbkami osocza. Największy spadek zawartości ENT obserwowano dla próbek osocza inkubowanych w temperaturze 36,6°C. W obydwu przypadkach, próbki pozostawione w temperaturze pokojowej oraz 4°C do 5 h mogą być analizowane bez obawy zachwiania poprawności otrzymywanych rezultatów.

W finalnym etapie adaptacji metody chromatograficznej przeprowadzono walidację dla obydwu wykorzystywanych matryc biologicznych, a wyniki przedstawiono na rycinach 66 i 67 oraz w tabelach 23 i 24. Niższą granicę oznaczalności udało się uzyskać dla próbek śliny. Podobnie jak w przypadku próbek moczu, brak jest doniesień literaturowych dotyczących wykorzystania detekcji FLD w oznaczaniu ENT w próbkach osocza i śliny, dlatego w tabeli 30 porównano wartości wybranych parametrów uzyskanych dla metod FLD i UV.

**Tabela 30.** Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT opracowanych dla próbek osocza i śliny.

Parametry	Osocze		Ślina	
	Detekcja UV	Detekcja FLD	Detekcja UV	Detekcja FLD
Zakres liniowości ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,4-8	0,096-40	0,16-40	0,08-40
$R^2$	0,999	0,999	0,999	0,999
LOD ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,24	0,016	0,08	0,04
LOQ ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	0,4	0,096	0,16	0,08
Precyzja wewnątrz-dniowa (RSD%)	2,8-9,2	1,7-5,6	1,9-9,5	1,1-4,5
Precyzja między-dniowa (RSD%)	4,1-9,9	1,9-6,2	4,2-10,6	2,4-4,8

Osiągnięcie niższych LOD i LOQ jest możliwe z wykorzystaniem detekcji FLD w przypadku obydwu matryc biologicznych. Dla próbek osocza LOQ jest aż 4-krotnie niższa, a zakres liniowości jest znacznie szerszy. Wyznaczona wartość LOQ dla próbek śliny jest jedynie 2-krotnie niższa, a zakresy liniowości uzyskane z wykorzystaniem dwóch sposobów detekcji są zbliżone do siebie. Można więc stwierdzić, iż w przypadku zastosowania detekcji spektrofluorymetrycznej osiąga się lepsze wyniki, co jest zgodne z założeniami, które przyświecały pomysłowi rozwinięcia nowej metodyki.

Powinno się podkreślić, iż cała metodologia oznaczania ENT w próbkach moczu, osocza i śliny, wykorzystująca technikę HPLC-FLD, jest nowatorska. W przyszłości, wyniki pozyskane ze zoptymalizowanych procedur oryginalnego opracowania naukowego, mogą być wykorzystane rutynowo w analizie klinicznej i posłużyć do rozwinięcia badań nad biodostępnością i szybkością metabolizmu ENT w różnych matrycach biologicznych.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI KOŃCOWE

Zakażenia patogenami chorobotwórczymi przenoszonymi drogą krwi, do których należą między innymi ludzki wirus niedoboru odporności (HIV) oraz wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), stanowią poważny problem epidemiologiczny, społeczny i kliniczny na całym globie [1-5,12-14]. Epidemiolodzy uważają, że aby zatrzymać transmisję wirusów HBV i HIV należy zastosować terapię przeciwwirusową u osób zakażonych, jak również profilaktykę pre-ekspozycyjną u grup podwyższonego ryzyka. Ma się to odbywać przy zastosowaniu odpowiednio dobranych leków oraz ich dawek. Najczęściej stosowanymi lekami w zakażeniach HIV/HBV są TFV oraz ENT [28,32,35,54,56,57]. Zadaniem dedykowanej terapii jest nie tylko zmniejszenie liczby zgonów wśród osób zakażonych, ale przede wszystkim poprawa ich jakości życia oraz zmniejszenie transmisji wirusa u grup podwyższonego ryzyka.

Niebezpieczeństwo związane z nefrotoksycznością leków przeciwwirusowych w tym TFV i ENT zależy przede wszystkim od ich stężenia, ponieważ są one wydalane głównie przez kanaliki nerkowe [41-43,58,64]. Monitorowanie zawartości wyżej wymienionych leków w płynach ustrojowych jest więc przydatne do kontrolowania dawek terapeutycznych. Jest to również istotne dla ustalenia wpływu terapii na prawidłową czynność nerek. Jednym z najczęściej wykorzystywanych badań w ocenie funkcjonowania nerek jest tzw. „klirens kreatyniny”. Badanie to określa zdolność nerek do oczyszczania krwi i wyznacza się go poprzez obliczenie stosunku stężenia kreatyniny we krwi, do jej stężenia w moczu [63,66]. Nieprawidłowy poziom kreatyniny jednoznacznie wskazuje na choroby nerek.

Wyniki otrzymane przy zastosowaniu opracowanych protokołów umożliwią uzyskanie informacji na temat wydalania leków przeciwwirusowych z moczem, ich bioakumulacji w osoczu, biodostępności w ślinie oraz dokonanie oceny toksycznego działania na funkcjonowanie nerek. Takie możliwości powinny przyczynić się do uproszczenia kontroli zdrowia pacjentów i poprawy ich jakości życia. W dłuższej perspektywie opisane protokoły mogłyby zostać wykorzystane do badań przeprowadzanych na dużych populacjach ludzi, przyczyniając się do wczesnej diagnozy chorób nerek u osób leczonych ENT i TFV. Tak obszerna problematyka wymagała podzielenia badań na kilka głównych etapów.

Pierwsza część przeprowadzanych przeze mnie eksperymentów zaprezentowana w rozdziałach 7 i 8 obejmowała, optymalizację warunków rozdzielania

chromatograficznego i procesu przygotowania próbek do analizy, umożliwiających jednoczesną separację i identyfikację Crn i TFV w próbkach moczu i osocza. W celu weryfikacji wiarygodności otrzymanych wyników, przeprowadzono walidację metod wraz z badaniem stabilności analitów dla obydwu matryc biologicznych. Opracowana metoda umożliwiła monitorowanie stężenia TFV w moczu i wyznaczenie profilu farmakokinetycznego wydalania leku [142]. Ostatnim etapem tej części pracy była adaptacja warunków separacji oraz przygotowania próbki do oznaczania zawartości TFV w ślinie, a także walidacja stworzonego protokołu (rozdział 9). Opracowane metody bazowały na technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detekcją spektrofotometryczną.

W kolejnym etapie badań zoptymalizowano i zwalidowano metody oznaczania Crn obok drugiego z leków przeciwwirusowych - ENT w próbkach moczu i osocza. Otrzymaną metodę zaadaptowano do oznaczania ENT w próbkach śliny. Rozwijane metody bazowały na technice chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrofotometryczną (rozdział 10).

Trzecią – ostatnią częścią przeprowadzonych eksperymentów było opracowanie metod oznaczania ENT w próbkach moczu, osocza i śliny za pomocą chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrofluorymetryczną (rozdział 11). Dzięki naturalnym zdolnościom ENT do fluorescencji, możliwe było oznaczenie badanego związku bez przeprowadzania procesu derywatyzacji chemicznej. Opracowane procedury analityczne zwalidowano i porównano z wynikami uzyskanymi przy użyciu techniki chromatografii cieczowej z detekcją spektrofotometryczną.

Niniejsza rozprawa doktorska jest dokumentem potwierdzającym możliwości wykorzystania chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją UV-Vis bądź FLD, jako wiarygodnego i precyzyjnego narzędzia w analizie złożonych próbek biologicznych. W efekcie, opracowane protokoły analityczne mogą być alternatywnymi źródłami informacji, w odniesieniu do pokrewnych, bazujących na wykorzystaniu detektorów spektrometrii mas [28,33,113-116,118-124,129,131-133,135-137]. Przeprowadzone badania wykazały, iż niezależnie od rodzaju matrycy biologicznej, proces przygotowania próbki do analizy może być prosty i opierać się jedynie na jej rozcieńczeniu (mocz) lub rozcieńczeniu i deprotenizacji (osocze, ślina). Największą nowością zoptymalizowanych metodyk jest zdolność jednoczesnego wykrywania i oznaczania wybranych leków przeciwwirusowych (TFV, ENT) oraz kreatyniny, ważnego wskaźnika funkcjonowania nerek.

Na podstawie wyników uzyskanych w trakcie eksperymentalnych badań przeprowadzonych podczas trwania studiów doktoranckich można wyciągnąć następujące wnioski:

- ✚ wysokosprawna chromatografia cieczowa stanowi precyzyjne i dokładne narzędzie analityczne umożliwiające oznaczanie TFV, ENT i Crn w moczu, osoczu i ślinie człowieka,
- ✚ zastosowanie powszechnie dostępnego detektora UV-Vis oraz bardzo prostych procedur przygotowania próbek do analizy, wpływa pozytywnie na aspekt ekonomiczny, przez co zaproponowane metodologie może zostać wykorzystana w rutynowych analizach laboratoryjnych,
- ✚ opracowana metodyka jednoczesnego oznaczania TFV i Crn [142] oraz ENT i Crn może być z powodzeniem wykorzystywana w analizie moczu i osocza, umożliwiając jednoczesną kontrolę funkcjonowania nerek pacjentów traktowanych tymi lekami,
- ✚ możliwe jest określenie farmakokinetyki wydalania leków przeciwwirusowych w moczu z jednoczesną normalizacją ich stężenia względem Crn,
- ✚ zaprezentowane procedury wymagają użycia niewielkich objętości próbek biologicznych,
- ✚ zastosowanie detektora FLD w analizie ENT umożliwiło obniżenie granic wykrywalności i oznaczalności, a także poszerzenie zakresu liniowości, w porównaniu z detekcją UV,
- ✚ zoptymalizowane procedury wykorzystujące technikę HPLC-UV/FLD spełniają kryteria walidacyjne stawiane przez FDA i ICH metodom dedykowanym próbkom biologicznym,
- ✚ zoptymalizowane procedury analityczne umożliwiają zminimalizowanie zużycia toksycznych rozpuszczalników organicznych i ograniczenie ilości odpadów laboratoryjnych (np. próbówki, końcówki do pipet, filtry membranowe).

## BIBLIOGRAFIA

- [1] A. Markowska, *Zdrowie ludzi i długość życia*. Nowiny Lekarskie. 2008, 77, 1, 56–62.
- [2] Z. Kiliańska, *Geny wirusa HIV charakterystyka i rola produktów ich ekspresji*. Kosmos. 1992, 41, 159—177.
- [3] M. Ankiersztejn-Bartczak, (2013). *Psychospołeczna sytuacja osób żyjących z HIV i chorych na AIDS w Polsce*. Rozprawa doktorska, Uniwersytet Warszawski.  
<https://depotuw.ceon.pl/bitstream/handle/item/422/praca%20%20dr%20MAB%20OST.pdf?sequence=1> (Dostęp: lipiec 2020)
- [4] D. Rogowska-Szadkowska, *Historia naturalna zakażenia HIV*. W: T. Niemiec, *Kliniczne i psychospołeczne aspekty zakażenia HIV u kobiet*. Krajowe Centrum ds. AIDS. Warszawa 2001, 21 - 22.
- [5] World Health Organization, *Scaling up antiretroviral therapy in resource, Guidelines for a public health approach*, 2002.  
[https://www.who.int/hiv/pub/prev\\_care/en/ScalingUp\\_E.pdf?ua=1](https://www.who.int/hiv/pub/prev_care/en/ScalingUp_E.pdf?ua=1)  
(Dostęp: czerwiec 2020)
- [6] W. Halota, *Zapobieganie zakażeniom HIV, zasady poradnictwa*. W: W. Halota, *Zakażenia HIV i AIDS w praktyce lekarskiej*. Podręcznik dla studentów medycyny i lekarzy, Krajowe Biuro Koordynacyjne ds. Zapobiegania AIDS, Szczecin 1999, 146.
- [7] W. Szata, *Sytuacja epidemiologiczna zakażeń HIV i AIDS w Polsce w latach 1985–2002, Polska strategia zapobiegania HIV/AIDS w latach 1985–2002*. Krajowe Centrum ds. AIDS. Warszawa 2002, 14–17.
- [8] D. Rogowska-Szadkowska, *ABC wiedzy o HIV/AIDS*, W: Departament Wychowania i Promocji Obronności – Ministerstwo Obrony Narodowej. Warszawa 2010, 7-18.
- [9] Joint United Nations Programme on HIV/AIDS, UNAIDS, 2018. Geneva, Switzerland. [https://www.unaids.org/en/20180718\\_GR2018](https://www.unaids.org/en/20180718_GR2018) (Dostęp: czerwiec 2020)
- [10] M. Parczewski, M. Bociąga-Jaśnik, M. Ingot, E. Mularska, M. Witak-Jędra, Polskie Towarzystwo Naukowe, *Zasady opieki nad osobami zakażonymi HIV*. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Naukowego AIDS. Warszawa-Szczecin 2019.
- [11] Raport UNAIDS, 2019.  
[https://www.unaids.org/sites/default/files/media\\_asset/2019-UNAIDS-data\\_en.pdf](https://www.unaids.org/sites/default/files/media_asset/2019-UNAIDS-data_en.pdf)  
(Dostęp: lipiec 2020).

- [12] J. Cianciara, *Wirusowe zapalenie wątroby typu B*. W: J. Cianciara, J. Juszczyk, *Choroby zakaźne i pasożytnicze*. Czelej. Lublin 2007, 593 – 600.
- [13] A. Adamek, *Zakażenie HBV- uwagi praktyczne*. Przegląd Urologiczny. 2007, 8, 29-31.
- [14] Z. Awan, M. Idrees, I. Amin, S. Butt, S. Afzal, et all., *Pattern and molecular epidemiology of Hepatitis B virus genotypes circulating in Pakistan*. Infection. Genetics. Evolution. 2010, 10(8), 1242-1246.
- [15] V. Bruss, *Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid*. Virus Research. 2004, 106(2), 199-209.
- [16] A. Dembińska Kieć, J. Naskalski, *Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej: podręcznik dla studentów medycyny*. Elsevier Urban & Partner. Wrocław 2010, 751-768.
- [17] S. Pungpapong, R. Kim, J. Poterucha, *Natural history of hepatitis B virus infection: an update for clinicians*. Mayo Clinic Proceedings. 2007, 82(8), 967-975.
- [18] J. Juszczyk, *Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B*. W: A. Szczeklik *Choroby wewnętrzne. Stan wiedzy na rok 2010*. Medycyna Praktyczna. Kraków 2010, 975-978.
- [19] D. Lavanchy, *Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures*. Journal of Viral Hepatitis. 2004, 11(2), 97-107.
- [20] J. Juszczyk, B. Walewska-Zielecka, *Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu B*. [https://www.mp.pl/szczepienia/choroby/choroby\\_wzwb/91243.przewlekle-wirusowe-zapalenie-watroby-typu-b](https://www.mp.pl/szczepienia/choroby/choroby_wzwb/91243.przewlekle-wirusowe-zapalenie-watroby-typu-b) (Dostęp: lipiec 2020)
- [21] Hepatitis B Foundation. *Hepatitis B vaccine history*. <https://www.hepb.org/prevention-and-diagnosis/vaccination/history-of-hepatitis-b-vaccine/> (Dostęp: lipiec 2020)
- [22] W. Magdzik, *Wirusowe zapalenie wątroby typu B (WZW B)*. Zakażenia. 2008, 3, 53-61.
- [23] World Health Organization, Health topics/Hepatitis. [https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/hepatitis#tab=tab_1) (Dostęp lipiec 2020)
- [24] J. Ghosn, B. Taiwo, S. Seedat, B. Autran, C. Katlama, *HIV*. Lancet. 2018, 392, 685-697.
- [25] B. Knysz, D. Rogowska-Szadkowska, J. Gąsiorowski, A. Gładysz, *Zespoły rekonstrukcji immunologicznej jako następstwo skutecznej terapii*

- antyretrowirusowej*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2005, 59, 180-187.
- [26] S. Broder, *The development of antiretroviral therapy and its impact on the HIV-1/AIDS pandemic*. Antiviral Research. 2010, 85(1), 1– 18.
- [27] A. Gładysz, B. Knysz, *Diagnostyka, profilaktyka, klinika i terapia zakażeń HIV/AIDS- współczesne możliwości i problemy*. Continuo. Wrocław 2009.
- [28] R. K. Valluru, P. B. Reddy, K. Sumanth, P. Kumar, N. B. Kilaru, *High throughput LC-MS/MS method for simultaneous determination of tenofovir, lamivudine and nevirapine in human plasma*. Journal of Chromatography B. 2013, 931, 117-126.
- [29] B. Knysz, *Proponowane przez PTN AIDS schematy terapeutyczne do stosowania u osób zakażonych HIV w celu opracowania programu polityki zdrowotnej PN. „Leczenie antyretrowirusowe osób żyjących z wirusem HIV w Polsce na lata 2017-2021”*. [http://www.ptnaids.pl/pliki/PROPONOWANE\\_SCHEMATY\\_TERAPEUTYCZNE.pdf](http://www.ptnaids.pl/pliki/PROPONOWANE_SCHEMATY_TERAPEUTYCZNE.pdf) (Dostęp: sierpień 2020).
- [30] B. Szetela, J. Gąsiorowski, R. Krygier, *Zakażenie HIV i AIDS a wybór pierwszego zestawu leków antyretrowirusowych*. Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej. 2008, 62, 28-35.
- [31] M. Bociąga-Jasik, A. Kalinowska-Nowak, A. Garlicki, *Współczesna terapia antyretrowirusowa – kryteria racjonalnego wyboru nukleozydowych inhibitorów odwrotnej transkryptazy (nrtis)*. Forum Zakażeń. 2015, 6, 59–63.
- [32] R. Scherzer, M. Estrella, Y. Li, S. G. Deeks, C. Grunfeld, M. G. Shlipak, *Association of tenofovir exposure with kidney disease risk in HIV infection*. AIDS. 2012, 26(7), 867–875.
- [33] M. El Barkil, M.-C. Gagnieu, J. Guitton, *Relevance of a combined UV and single mass spectrometry detection for the determination of tenofovir in human plasma by HPLC in therapeutic drug monitoring*. Journal of Chromatography B. 2007, 854, 192-197.
- [34] A.M. Hall, B.M. Hendry, D. Nitsch, J.O. Connolly, *Tenofovir-associated kidney toxicity in HIV-infected patients: a review of the evidence*. American Journal of Kidney Diseases. 2011, 57(5), 773–780.
- [35] A. Parfieniuk-Kowerda, R. Flisiak, *Tenofovir w terapii zakażeń HBV*. Medical Science Review – Hepatologia. 2011, 11, 41-44.
- [36] V.M. Golla, M. Kurmi, K. Shaik, S. Singh, *Stability behaviour of antiretroviral drugs and their combinations. 4: Characterization of degradation products of*



- tenofovir alafenamide fumarate and comparison of its degradation and stability behaviour with tenofovir disoproxil fumarate*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016, 131, 146-155.
- [37] C.L. Woodward, A.M. Hall, L.G. Williams, S. Madge, A. Copas, et al., *Tenofovir-associated renal and bone toxicity*. HIV Medicine. 2009, 10(8), 482–487.
- [38] J.L. Casado, J.M. Del Rey, S. Bañón, C. Santiuste, M. Rodriguez et al., *Changes in kidney function and in the rate of tubular dysfunction after tenofovir withdrawal or continuation in HIV-infected patients*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2016, 72(4), 416-422.
- [39] P. Labarga, P. Barreiro, L. Martin-Carbonero, S. Rodriguez-Novoa, C. Solera et al., *Kidney tubular abnormalities in the absence of impaired glomerular function in HIV patients treated with tenofovir*. AIDS. 2009, 23(6), 689-696.
- [40] F.A. Dauchy, S. Lawson-Ayayi, R. De La Faille, F. Bonnet, C. Rigothier et al., *Increased risk of abnormal proximal renal tubular function with HIV infection and antiretroviral therapy*. Kidney International. 2011, 80(3), 302–309.
- [41] D. Verhelst, M. Monge, J.L. Meynard, B. Fouqueray, B. Mougénot et al., *Fanconi syndrome and renal failure induced by tenofovir: a first case report*. American Journal of Kidney Diseases. 2002, 40(6), 1331–1333.
- [42] B. Fernandez-Fernandez, A. Montoya-Ferrer, A. B. Sanz, M. D. Sanchez-Nino, M.C. Izquierdo et al., *Tenofovir Nephrotoxicity: 2011 Update*. AIDS Research and Treatment. 2011, 2011, 354908.
- [43] S.K. Gupta, J.A. Eustace, J.A. Winston, I. I. Boydstun, T. S. Ahuja et al., *Guidelines for the Management of Chronic Kidney Disease in HIV-Infected Patients: Recommendations of the HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America*. Clinical Infectious Diseases. 2005, 40(11), 1559-1585.
- [44] P.J. Ruane, E. DeJesus, D. Berger, M. Markowitz, U. F. Bredeek et al., *Antiviral activity, safety, and pharmacokinetics/pharmacodynamics of tenofovir alafenamide as 10-day monotherapy in HIV-1-positive adults*. Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes. 2013, 63(4), 449– 455.
- [45] P.E. Sax, D. Wohl, M.T. Yin, F. Post, E. DeJesus et al., *Tenofovir alafenamide versus tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials*. Lancet. 2015, 385(9987), 2606–2615.

- [46] C. Callebaut, G. Stepan, Y. Tian, M.D. Miller, *In vitro virology profile of tenofovir alafenamide, a novel oral prodrug of tenofovir with improved antiviral activity compared to that of tenofovir disoproxil fumarate*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015, 59(10), 5909–5916.
- [47] F. Zoulim. *Antiviral therapy of chronic hepatitis B*. *Antiviral Research*. 2006, 71 (2-3), 206–215.
- [48] R. Flisiak, W. Halota, J. Jaroszewicz, J. Juszczyk, P. Małkowski et al., *Zalecenia Polskiej Grupy Ekspertów HBV dotyczące leczenia przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B w 2018 roku*. *Hepatology*. 2018, 18, 10–21.
- [49] K. Simon, A. Szymczak, *Zasady kwalifikacji, leczenia i monitorowania chorych przewlekle zakażonych HBV według aktualnego stanu wiedzy*. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2004, 13(5), 839–845.
- [50] W. S. Ayoub, E. B. Keeffe, *Current antiviral therapy of chronic hepatitis B*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2011, 34, 1145–1158.
- [51] J. Janocha-Litwin, K. Simon, *Czynniki dobrej odpowiedzi na leczenie przeciwwirusowe zakażenia HBV*. *Family Medicine and Primary Care Review*. 2014, 16(1), 44–47.
- [52] European Association for the Study of the Liver. *EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection*. *Journal of Hepatology*. 2017, 67(2), 370-398.
- [53] R. de Franchis, A. Hadengue, G. Lau, D. Lavanchy, A. Lok, N. McIntyre, A. Mele et al., *EASL International Consensus Conference On Hepatitis B*. *Journal of Hepatology*, 2003, 39, 3–25.
- [54] C.O. Wilson, J. M. Beale, J. H. Block (2011). *Wilson and Gisvold's textbook of organic medicinal and pharmaceutical chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- [55] T.T. Chang, Y.F. Liaw, S.S. Wu, E. Schiff, K. H. Han, et al., *Long-term entecavir therapy results in the reversal of fibrosis/cirrhosis and continued histological improvement in patients with chronic hepatitis B*. *Hepatology*. 2010, 52(3), 886–893.
- [56] S.H. Lee, G.J. Cheon, H.S. Kim, S. G. Kim, Y. S. Kim et al., *Tenofovir disoproxil fumarate monotherapy is superior to entecavir-adeфовir combination therapy in patients with suboptimal response to lamivudine-adeфовir therapy for nucleoside-resistant HBV: a 96-week prospective multicentre trial*. *Antiviral Therapy*. 2018, 23(3), 219-227.

- [57] L. He, X. Liu, Y. Zhao, S. Zhang, Y. Jiang, X. Wang et al., *Efficacy of nucleot(s)ide analogs therapy in patients with unresectable hbv-related hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis*. Disease Markers. 2017, 1–10.
- [58] Charakterystyka produktu leczniczego Baraclude® zawierającego entekawir. [https://packageinserts.bms.com/pi/pi\\_baraclude.pdf](https://packageinserts.bms.com/pi/pi_baraclude.pdf) (Dostęp: sierpień 2020).
- [59] Medycyna praktyczna. Baza leków. Entekawir (opis profesjonalny). [https://bazalekow.mp.pl/leki/doctor\\_subst.html?id=4611](https://bazalekow.mp.pl/leki/doctor_subst.html?id=4611) (Dostęp: sierpień 2020).
- [60] M. Fic, M. Kaplewska, *Kreatynina na wyciągnięcie ręki*. W: Nauki Przyrodnicze i Medyczne: Żywnienie, sport oraz zdrowie. Red. J. Bednarski, M. Bajda, Instytut Promocji Kultury i Nauki, Lublin, 2018. ISBN 978-83-950719-4-2 <http://ipkn.edu.pl/wp-content/uploads/2018/07/Nauki-Przyrodnicze-i-Medyczne-%C5%BBywnienie-sport-oraz-zdrowie.pdf> (Dostęp: wrzesień 2020).
- [61] W. J. Kraemer, J. S. Volek, *Creatine supplementation. Its role in human performance*. Clinics in Sports Medicine. 1999, 18(3), 651-666.
- [62] S. Fraselle, K. De Cremer, W. Coucke, G. Glorieux, J. Vanmassenhove et al., *Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method to measure creatinine in human urine*. Journal of Chromatography B. 2015, 988, 88-97.
- [63] A. Dembińska-Kieć, J.W. Naskalski, Diagnostyka laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej. Wydanie III poprawione i uzupełnione, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner. 2012.
- [64] C. Stephens, J. Seladi-Schulman, *Symptoms of high creatinine levels*. <https://www.healthline.com/health/high-creatinine-symptoms#symptoms> (Dostęp: wrzesień 2020).
- [65] C. Stephens, V. Higuera, *Low creatinine: what you need to know*. <https://www.healthline.com/health/low-creatinine#symptoms> (Dostęp: wrzesień 2020).
- [66] Ł. Zdrojewski, B. Rutkowski. *MDRD czy CKD-EPI — rewolucja czy ewolucja?* Forum Nefrologiczne. 2014, 7, 38–44.
- [67] D. Tsikas, A. Wolf, A. Mitschke, F.M. Gutzki, W. Will, M. Bader, *GC–MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays*. Journal of Chromatography B. 2010, 878(27), 2582–2592.

- [68] K. Kuśmierk, R. Głowacki, E. Bald, *Analysis of urine for cysteine, cysteinylglycine, and homocysteine by high-performance liquid chromatography*. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2006, 385(5), 855–860.
- [69] L.A. Colon, *Analysis of body fluids: urine, blood, saliva and tears*. W: H. Shintani, J. Polonský, *Handbook of Capillary Electrophoresis Applications*. Springer, Dordrecht, Londyn 1997, ISBN 978-9-40-107197-0.
- [70] Ż. Polkowska, K. Kozłowska, J. Namieśnik, *Płyny biologiczne jako źródło informacji o narażeniu człowieka na środowiskowe czynniki chemiczne*, W: J. Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. CCEAM, 579-599. Gdańsk 2003.
- [71] S. Bouatra, F. Aziat, R. Mandal, A.C. Guo, M. R. Wilson et al. (2013) The Human Urine Metabolome. PLoS ONE 2013, 8(9), 73076.
- [72] W. Pawelski, S. Maj, *Układ moczowy: Normy i diagnostyka chorób wewnętrznych*. Wyd. I. PZWL, Warszawa 1993, ISBN 83-200-1645-2.
- [73] Diagnostyka Laboratoryjna Tom 1, [red] A. Szutowicz, A. Raszei-Specht, Uniwersytet Medyczny, Gdański, 2009, ISBN 978-83-602535-7-1.
- [74] *Monitoring biologiczny narażenia na czynniki chemiczne w środowisku pracy*, [red] M. Jakubowski, Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1997, ISBN 8386052422.
- [75] J.J. Tomaszewski, *Diagnostyka laboratoryjna*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001, ISBN: 978-83-200-4644-1.
- [76] K. W. Aaron Tang, Q. Ch. Toh, B. W. Teo, *Normalisation of urinary biomarkers to creatinine for clinical practice and research – when and why*. Singapore Medical Journal. 2015, 56(1), 7–10.
- [77] C. Dutkiewicz, C. Andryszek, J. Kończalik, Z. Murowaniecki, D. Rachański, R. Rolecki, T. Wasiela, *Ocena zagrożeń środowiskowych i zdrowotnych w dużych obszarach geograficznych*. Instytut Medycyny Pracy, Łódź, 1997.
- [78] A. Jarosz, *MOCZ: analiza. Podstawowe badanie moczu, które wiele mówi o stanie zdrowia*. Poradnik Zdrowie, 2014.
- [79] Ż. Polkowska, K. Kozłowska, J. Namieśnik, *Płyny biologiczne jako źródło informacji o narażeniu człowieka na środowiskowe czynniki chemiczne*. W: *Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym*. [red] J Namieśnik, W. Chrzanowski, P. Szpinek, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2003, ISBN: 83-919081-1-9

- [http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM\\_ksiazka\\_polska/Rozdzialy/rozdzial\\_028.pdf](http://www.pg.gda.pl/chem/CEEAM/Dokumenty/CEEAM_ksiazka_polska/Rozdzialy/rozdzial_028.pdf) (Dostęp: luty 2021).
- [80] BOOK: Anatomy and physiology (boundless) Libre texts. <https://courses.lumenlearning.com/boundless-ap/chapter/overview-of-blood/> (Dostęp: luty 2021).
- [81] E. N. Marieb, K. Hoehn, *Human Anatomy & Physiology*. Wyd. 7, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009. ISBN 0-321-37294-8.
- [82] G. Lippi, M. Montagnana, M. Franchini, *Ex-vivo red blood cells generation: a step ahead in transfusion medicine?* European Journal of Internal Medicine. 2011, 22(1), 16–19.
- [83] R.S. Schwartz, C. L. Conley, *Blood*. Encyclopedia Britannica, Invalid Date, <https://www.britannica.com/science/blood-biochemistry> (Dostęp: luty 2021).
- [84] Waugh, Grant, A., & Chambers, G. (2014). *Ross and Wilson anatomy & physiology in health and illness* (12th edition.). Churchill Livingstone Elsevier.
- [85] W. Sylwanowicz: *Anatomia i fizjologia człowieka*. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1990, ISBN 83-200-0168-4.
- [86] H. Refsum, A.D. Smith, P.M. Ueland, E. Nexø, R. Clarke, J. McPartlin, C. Johnston, F. Engbaek, J. Schneede, C. McPartlin, J.M. Scott, *Facts and Recommendations about Total Homocysteine Determinations: An Expert Opinion*. Clinical Chemistry. 2004, 50(1), 3–32.
- [87] D. O'Neil, *Blood Components W: Human blood: An introduction to its components and types*. Palomar College, San Marcos, California 1999-2014. <https://www2.palomar.edu/anthro/blood/default.htm> (Dostęp: luty 2021).
- [88] S. C. Madden, C. A. Finch, W. G. Swalbach, G. H. Whipple, *Blood plasma protein production and utilization : the influence of amino acids and of sterile abscesses*. Journal of Experimental Medicine. 1940, 71(3), 283–297.
- [89] M. Horański, *Badanie krwi, Żyjmy dłużej*. 1999, 8, 4.
- [90] *Glukoza we krwi - badanie glukozy w surowicy, norma. O czym świadczy niski poziom glukozy?* <https://www.medonet.pl/badania,glukoza-we-krwi---badanie-glukozy-w-surowicy--norma,artykul,1570132.html> (Dostęp: kwiecień 2021).
- [91] G. Lima-Oliveira, D. Monneret, F. Guerber, G. C. Guidi, *Sample management for clinical biochemistry assays: Are serum and plasma interchangeable specimens?* Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences. 2018, 55(7), 480-500.

- [92] *Wymagania dotyczące: pobierania, przechowywania i transportu materiału do badań laboratoryjnych – część A – LABORATORIUM CENTRALNE*. SPWSZ w Szczecinie: załącznik nr 5 część A z dnia 09.08.2019 do PA-DL-C/ z- 2 (Dostęp: kwiecień 2021).
- [93] M.A. Javaid , A.S. Ahmed, R. Durand, S.D. Tran, *Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases*. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research. 2016, 6(1), 66–75.
- [94] J. Piechocka, M. Wrońska, R. Głowacki, *Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva*. Trends in Analytical Chemistry. 2020, 126, 115866.
- [95] M. Malathi, E. Rajesh, N.A. Babu, S. Jimson, *Saliva as A Diagnostic Tool*. Biomedical and Pharmacology Journal. 2016, 9(2).
- [96] Z. Huang, X. Yang, Y. Huang, Z. Tang, Y. Chen, et al., *Saliva – a new opportunity for fluid biopsy*. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2023, 61(1), 4-32.
- [97] I. Ezhil, G. Savitha, M. P. Santhosh Kumar, *Saliva as a diagnostic tool: A review*. Drug Invention Today. 2018, 10(11), 2188-2193.
- [98] S. Martí-Álamo, A. Mancheño-Franch, C. Marzal-Gamarra, L. Carlos-Fabuel, *Saliva as a diagnostic fluid. Literature review*. Journal of Clinical and Experimental Dentistry. 2012, 4(4), 237-243.
- [99] S.K. Al-Tarawneh, M.B. Border, C.F. Dibble, S. Bencharit, *Defining Salivary Biomarkers Using Mass Spectrometry-Based Proteomics: A Systematic Review*. OMICS. 2011, 15(6), 353-361.
- [100] N. Spielmann, D.T Wong, *Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives*. Oral Diseases. 2011, 17(4), 345-354.
- [101] E. Kaufman E, I. B. Lamster, *Analysis of saliva for periodontal diagnosis- a review*. Journal of Clinical Periodontology. 2000, 27(7), 453-465.
- [102] J. Hicks, F. Garcia-Godoy, C. Flaitz, *Biological factors in dental caries: role of saliva and dental plaque in the dynamic process of demineralization and remineralization (part 1)*. Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2003, 28(1), 47-52.
- [103] L. Zhang, J.J. Farrell, H. Zhou, D. Elashoff, D. Akin et al., *Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer*. Gastroenterology. 2010, 138(3), 949-957.

- [104] C. Baldini, L. Giusti, F. Ciregia, Y. Da Valle, C. Giacomelli et al., *Proteomic analysis of saliva: a unique tool to distinguish primary Sjögren's syndrome from secondary Sjögren's syndrome and other sicca syndromes*. *Arthritis Research & Therapy*. 2011, 13(6), R194.
- [105] A.C. Gonçalves, F.A.d.L. Marson, R.M.d.H. Mendonça, J.D. Ribeiro, A.F. Ribeiro et al., *Saliva as a potential tool for cystic fibrosis diagnosis*. *Diagnostic Pathology*. 2013, 8, 46.
- [106] D. Malamud, *Oral diagnostic testing for detecting human immunodeficiency virus-1 antibodies: a technology whose time has come*. *The American Journal of Medicine*. 1997, 102(4A), 9-14.
- [107] D. Out, R.J. Hall, D.A. Granger, G.G. Page, S.J. Woods, *Assessing salivary C-reactive protein: Longitudinal associations with systemic inflammation and cardiovascular disease risk in women exposed to intimate partner violence*. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2012, 26(4), 543-551.
- [108] R. Sasikumar, R. Kannan, *Salivary glucose levels and oral candidal carriage in type II diabetics*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 2010, 109(5), 706-711.
- [109] T. Sri Santosh, R. Parmar, H. Anand, K. Srikanth, M. Saritha, *A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19*. *Cureus Journal of Medical Science*. 2020, 12, 7708.
- [110] R.W. Sparidans, K.M.L. Crommentruyn, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen, *Liquid chromatographic assay for the antiviral nucleotide analogue tenofovir in plasma using derivatization with chloroacetaldehyde*. *Journal of Chromatography B*. 2003, 791(1-2), 227-233.
- [111] V. Jullien, J.-M. Tréluyer, G. Pons, E. Rey, *Determination of tenofovir in human plasma by high-performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*. *Journal of Chromatography B*. 2003, 785(2), 377-381.
- [112] N.L. Rezk, R.D. Crutchley, A.D.M. Kashuba, *Simultaneous quantification of emtricitabine and tenofovir in human plasma using high-performance liquid chromatography after solid phase extraction*. *Journal of Chromatography B*. 2005, 822 (1-2), 201-208.
- [113] T. Delahunty, L. Bushman, C.V. Fletcher, *Sensitive assay for determining plasma tenofovir concentrations by LC/MS/MS*. *Journal of Chromatography B*. 2006, 830(1), 6-12.

- [114] N.A. Gomes, V.V. Vaidya, A. Pudage, S.S. Joshi, S.A. Parekh, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in human plasma and its application to a bioequivalence study*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2008, 48(3), 918-926.
- [115] A. D'Avolio, M. Sciandra, M. Siccardi, L. Baietto, D. Gonzalez de Requena, et al., *A New Assay Based on Solid-Phase Extraction Procedure with LC-MS to Measure Plasmatic Concentrations of Tenofovir and Emtricitabine in HIV Infected Patients*. Journal of Chromatographic Science. 2008, 46(6), 524-528.
- [116] T. Delahunty, L. Bushman, B. Robbins, C.V. Fletcher, *The simultaneous assay of tenofovir and emtricitabine in plasma using LC/MS/MS and isotopically labeled internal standards*. Journal of Chromatography B. 2009, 877(20-21), 1907-1914.
- [117] R. Tan, B. Yan, J. Shang, J. Yang, W. Huang, et al., *New solid phase extraction reversed phase high performance liquid chromatography ultraviolet (RP-HPLC-UV) method for simultaneous determination of tenofovir and emtricitabine in Chinese population*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2012, 6(26), 1890-1900.
- [118] Z. Djerada, C. Feliu, C. Tournois, D. Vautier, L. Binet et al., *Validation of a fast method for quantitative analysis of elvitegravir, raltegravir, maraviroc, etravirine, tenofovir, boceprevir and 10 other antiretroviral agents in human plasma samples with a new UPLC-MS/MS technology*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2013, 86, 100-111.
- [119] A.T. Podany, C. Sheldon, D. Grafelman, C.M. Ohnmacht, *Assay development for determination of tenofovir in human plasma by solid phase analytical derivatization and LC-MS/MS*. Bioanalysis. 2015, 7(24), 3085-3095.
- [120] A. De Nicolò, M. Simiele, D. Pensi, L. Boglione, S. Allegra, et al., *UPLC-MS/MS method for the simultaneous quantification of anti-HBV nucleos(t)ides analogs: Entecavir, lamivudine, telbivudine and tenofovir in plasma of HBV infected patients*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015, 114, 127-132.
- [121] Q. Xiao, D. Wang, W. Yang, L. Chen, Y. Ding, J. Yang, *Simultaneous determination of pradefovir, PMEA and tenofovir in HBV patient serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and application to phase 2 clinical trial*. Journal of Chromatography B. 2016, 1022, 133-140.



- [122] E. Mwando Jr., A. Massele, E. Sepako, K. Sichilongo, *A method employing SPE, MRM LC-MS/MS and a THF–water solvent system for the simultaneous determination of five antiretroviral drugs in human blood plasma*. Analytical Methods. 2017, 9(3), 450.
- [123] L. Zhao, Z. Li, Z. Zhou, X. Kang, B. Fang et al., *Simultaneous determination of tenofovir alafenamide and tenofovir in human plasma by LC-MS/MS and its application to pharmacokinetics study in clinic*. Journal of Chromatography B. 2019, 1117, 148-157.
- [124] D. Xiao, K. H. J. Ling, T. Tarnowski, S. R. Majeed, P. German et al., *An LC-MS/MS method for determination of tenofovir (TFV) in human plasma following tenofovir alafenamide (TAF) administration: Development, validation, cross-validation, and use of formic acid as plasma TFV stabilizer*. Analytical Biochemistry. 2020, 593, 113611.
- [125] M. Simiele, C. Carcieri, A. De Nicolò, A. Ariaudo, M. Sciandra et al., *A LC-MS method to quantify tenofovir urinary concentrations in treated patients*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015, 114, 8-11.
- [126] M. Gumustas, M. G. Caglayan, F. Onur, S. A. Ozkan, *Simultaneous determination and validation of emtricitabine, rilpivirine and tenofovir from biological samples using LC and CE methods*. Biomedical Chromatography. 2017, 32(4), 4158.
- [127] H.C. Koenig, K. Mounzer, G.W. Daughtridge, C.E. Sloan, L Lalley-Chareczko, et al., *Urine assay for tenofovir to monitor adherence in real time to tenofovir disoproxil fumarate/emtricitabine as pre-exposure prophylaxis*. HIV Medicine. 2017, 18(6), 412-418.
- [128] E. Yamada, R. Takagi, K. Sudo, S. Kato, *Determination of abacavir, tenofovir, darunavir, and raltegravir in human plasma and saliva using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2015, 114, 390-397.
- [129] D. Zhang, Y. Fu, J. P. Gale, A. F. Aubry, M. E. Arnol, *A sensitive method for the determination of entecavir at picogram per milliliter level in human plasma by solid phase extraction and high-pH LC–MS/MS*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2009, 49(4), 1027-1033.
- [130] S. L. Dalmora, M. Da Silva Sangoi, D. R. Nogueira, L. M. Da Silva, *Validation of a Stability-Indicating RP-HPLC Method for the Determination of Entecavir in Tablet Dosage Form*. Journal of AOAC International. 2010, 93(2), 523-530.

- [131] B. R. Challa, B. Z. Awen, B. R. Chandu, S. Rihanaparveen, *LC–ESI-MS/MS method for the quantification of entecavir in human plasma and its application to bioequivalence study*. Journal of Chromatography B. 2011, 879(11-12), 769-776.
- [132] F.J. Zhao, H. Tang, Q.H. Zhang, J. Yang, A. K. Davey, J.P. Wang, *Salting-out homogeneous liquid–liquid extraction approach applied in sample pre-processing for the quantitative determination of entecavir in human plasma by LC–MS*. Journal of Chromatography B. 2012, 881-882, 119-125.
- [133] L. Nováková, T. Gottvald, H. Vlcková, F. Trejtnar, J. Mandíková, P. Solich, *Highly sensitive fast determination of entecavir in rat urine by means of hydrophilic interaction chromatography–ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2012, 1259, 237- 243.
- [134] R. Rambabu, J. Subbarao, S. Vidyadhara, *Estimation and validation of entecavir in bulk and pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC*. International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2014, 5(4), 531-535.
- [135] H. Vlcková, J. Janák, T. Gottvald, F. Trejtnar, P. Solich, L. Nováková, *How to address the sample preparation of hydrophilic compounds: Determination of entecavir in plasma and plasma ultrafiltrate with novel extraction sorbents*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2014, 88, 337-344.
- [136] A. De Nicolò, G. Bonifacio, L. Boglione, J. Cusato, D. Pensi et al., *UHPLC–MS/MS method with automated on-line solid phase extraction for the quantification of entecavir in peripheral blood mononuclear cells of HBV+ patients*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016, 118, 64-69.
- [137] Q. Jiang, Y. Liu, Y. Wang, Y. Sun, B. Li, et al., *Simultaneous determination of entecavir and lamivudine in rat plasma by UPLC-MS/MS and its application to a pharmacokinetic study*. RSC Advances. 2016, 6(75), 70990-70998.
- [138] S. T. Deodhe, D. M. Dhabarde, M. A. Kamble, D. K. Mahapatra, *Development and validation of a novel stability indicating rp-hplc method for the estimation of entecavir in tablet formulation*. Eurasian Journal of Analytical Chemistry. 2017, 12(3), 223-235.
- [139] P. Swathi, S. Vidyadhara, R.L.C. Sasidhar, K. Chakravarthi, *Method development and validation for the estimation of entecavir in bulk and pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC*. International Journal of Current Pharmaceutical Research. 2017, 9(5), 107-111.

- [140] M. Ashraf, H.M.N. Shabbir, M.M. Hayat, J. Rahman, S. Ejaz, et al., *HPLC determination of entecavir in pure, tablet dosage form and spiked plasma*. Journal of the Chemical Society of Pakistan. 2017, 39, 1-5.
- [141] G. Manoharan, R.A.W. Mohamed, *Quantitative determination of entecavir in bulk and tablet formulation by a validated stability-indicating reversed-phase HPLC method*. Journal of Biochemical Technology. 2019, 10(1), 7-10.
- [142] P. Olejarz, G. Chwatko, P. Kubalczyk, K. Purgat, R. Głowacki, K. Borowczyk, *Application of high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples*. Pharmaceuticals. 2020, 13(11), 367.
- [143] K. Borowczyk, M. Wyszczelska-Rokiel, P. Kubalczyk, R. Głowacki, *Simultaneous determination of albumin and low-molecular-mass thiols in plasma by HPLC with UV detection*. Journal of Chromatography B. 2015, 981-982, 57-64.
- [144] A.J. Alpert, *Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds*. Journal of Chromatography A. 1990, 499, 177-196.
- [145] U.S. Department of Health and Human Services, FDA. Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry; FDA: 2013-D-1020. <https://www.fda.gov/media/70858/download> (Dostęp: maj 2021).
- [146] Medycyna praktyczna. Baza leków. Tenofowir (opis profesjonalny). <https://www.mp.pl/pacjent/leki/subst.html?id=4488> (Dostęp: styczeń 2023).
- [147] E. Moller, J.R. McIntosh, D.D. Van Slyke, *Studies of urea excretion.II: Relationship between urine volume and the rate of urea excretion by normal adults*. Journal of Clinical Investigation. 1928, 6(3), 427-465.
- [148] World Health Organization, Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis b infection, 2015. ISBN 978-92-4-154905-9. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549059> (Dostęp: czerwiec 2020)
- [149] World Health Organization, Key facts HIV, 2021. [cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/key-facts-hiv-2021-26july2022.pdf?sfvrsn=8f4e7c93\\_5](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/hq-hiv-hepatitis-and-stis-library/key-facts-hiv-2021-26july2022.pdf?sfvrsn=8f4e7c93_5) (Dostęp: styczeń 2023).
- [150] ICH M10. *Bioanalytical Method Validation*; International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: Geneva, Switzerland, 2019;

[https://database.ich.org/sites/default/files/M10\\_EWG\\_Draft\\_Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/M10_EWG_Draft_Guideline.pdf)

(Dostęp: maj 2021).

- [151] T.R. Cressey, O. Siriprakaisil, R.W. Kubiak, V. Klinbuayaem, Pra-ornsuda Sukrakanchana et al., *Plasma pharmacokinetics and urinary excretion of tenofovir following cessation in adults with controlled levels of adherence to tenofovir disoproxil fumarate*. International Journal of Infectious Diseases. 2020, 97, 365-370.
- [152] A. Calcagno, J. Cusato, L. Marinaro, L. Trentini, C. Alcantarini, et al., *Clinical pharmacology of tenofovir clearance: a pharmacokinetic/pharmacogenetic study on plasma and urines*. The Pharmacogenomics Journal, 2016, 16(6), 514-518.
- [153] S. Moldoveanu, V. David, Book: *Modern Sample Preparation for Chromatography. Chapter 12. Comments on Sample Preparation in Chromatography for Different Types of Materials*. 2015, 411-446.
- [154] K.A. Kaiser, C.E. Merrywell, F. Fang, C.K. Larive, *Metabolic profiling: Chapter 5. NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. 2008, 233-267.
- [155] V. De Lastours, J. Fonsart, R. Burlacu, B. Gourmel, J.M. Molina, *Concentrations of tenofovir and emtricitabine in saliva: implications for preexposure prophylaxis of oral HIV acquisition*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011, 55(10), 4905-4907.
- [156] Z. Wu, Y. Gong, J. Peng, X. Zhang, L. Tang, *Correlation between serum entecavir concentration and virological response in patients with chronic type B hepatitis*. Medical Science Monitor. 2019, 18, 6998-7004.
- [157] H. Franz and V. Jendreizik, *Handbook: Fluorescence method development*, Thermo Fisher Scientific, Germering, Germany, 2013. [http://www.dionex.com/en-us/webdocs/113591-Handbk-FLD-3000-Method-Develop-AN70302\\_E.pdf](http://www.dionex.com/en-us/webdocs/113591-Handbk-FLD-3000-Method-Develop-AN70302_E.pdf). (Dostęp: styczeń 2023).

## SPIS RYCIN

<b>Ryc. 1.</b> Globalna liczba zgonów związanych z AIDS w latach 1990–2018. Źródło: Raport UNAIDS 2019. ....	12
<b>Ryc. 2.</b> Globalna liczba nowych zakażeń HIV w latach 1990–2018. Źródło: Raport... 13	13
<b>Ryc. 3.</b> Dystrybucja nowych zakażeń HIV przedstawiona w oparciu o grupy populacji w odniesieniu do roku 2018. Źródło: Raport UNAIDS 2019. ....	13
<b>Ryc. 4.</b> Wzór strukturalny fumaranu tenofowiru dizoproksylu (TDF).....	19
<b>Ryc. 5.</b> Wzór strukturalny alafenamidu tenofowiru (TAF). ....	20
<b>Ryc. 6.</b> Wzór strukturalny entekawiru (ENT). ....	23
<b>Ryc. 7.</b> Wzór strukturalny kreatyniny. ....	24
<b>Ryc. 8.</b> Widma Crn (A) i TFV (B) zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm), elucja izokratyczna 3% MeCN i 97% PB (0,01 mol l <sup>-1</sup> , pH 7), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml min <sup>-1</sup> . ....	58
<b>Ryc. 9.</b> Wykresy przedstawiające wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzących od TFV (A) i Crn (B), n = 3. ....	59
<b>Ryc. 10.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B), n = 3. ....	60
<b>Ryc. 11.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B), n = 3. ....	60
<b>Ryc. 12.</b> Chromatogram otrzymany dla standardu TFV o stężeniu 50 μg ml <sup>-1</sup> , próbki moczu ochotnika nieprzyjmującego leku oraz moczu pacjenta poddanego terapii TFV w dawce 123 mg. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 (150×4,6 mm, 5 μm), elucja gradientowa: 0-6 min 2-4% MeCN, 6-7 min 4-2% MeCN i 7-8 min 2% MeCN, PB (0,015 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,4), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml min <sup>-1</sup> . ....	62
<b>Ryc. 13.</b> Stabilność Crn (A) i TFV (B) w moczu w temperaturze 37 i 4°C w czasie 240 minut, n= 3 [142]. ....	63
<b>Ryc. 14.</b> Stabilność TFV w próbce moczu przy kilkukrotnym rozmrożeniu w 4°C i zamrożeniu w -20°C, n= 3. ....	64
<b>Ryc. 15.</b> Stabilność Crn w próbce moczu przy kilkukrotnym rozmrożeniu w 4°C i zamrożeniu w -20°C, n= 3. ....	64
<b>Ryc. 16.</b> Krzywa kalibracyjna dla TFV sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia TFV w próbce moczu, n = 3. ....	66
<b>Ryc. 17.</b> Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od jej stężenia w próbce moczu, n = 3. ....	66

<b>Ryc. 18.</b> Profil farmakokinetyczny wydalania TFV z moczem w czasie 8 h po zażyciu przez Pacjenta 1 preparatu farmaceutycznego Viread w dawce 123 mg, n= 3 [142]. ....	69
<b>Ryc. 19.</b> Wykresy przedstawiające wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni piku pochodzącego od TFV (A) i Crn (B), n= 3. ....	71
<b>Ryc. 20.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B), n=3. ....	71
<b>Ryc. 21.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czas retencji sygnałów pochodzących od TFV (A) i Crn (B), n=3. ....	72
<b>Ryc. 22.</b> Wpływ objętości odczynnika deprotenizującego białko na zawartość TFV (A) i Crn (B) w próbkach osocza, n = 3.....	74
<b>Ryc. 23.</b> Stabilność Crn (A) i TFV (B) w osoczu w temperaturze 37 i 4°C w czasie 160 minut, n= 3 [142].....	75
<b>Ryc. 24.</b> Trwałość TFV w próbce osocza przy kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze -20°C i rozmrażaniu w 4°C, n = 3.....	76
<b>Ryc. 25.</b> Trwałość Crn w próbce osocza przy kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze -20°C i rozmrożeniu w 4°C, n = 3.....	76
<b>Ryc. 26.</b> Wykres zależności pola powierzchni piku TFV od jego stężenia w próbkach osocza, n = 3.....	77
<b>Ryc. 27.</b> Wykres zależności pola powierzchni piku Crn od jej stężenia w próbkach osocza, n = 3.....	78
<b>Ryc. 28.</b> Chromatogramy próbki osocza przed i po wzbogaceniu standardem TFV o stężeniu 25 µg ml <sup>-1</sup> i Crn 0,2 µmol ml <sup>-1</sup> . Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 (150×4,6 mm, 5 µm), elucja izokratyczna: 2% MeCN i 98% PB (0,015 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,4), temperatura kolumny 25°, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml min <sup>-1</sup> . ....	79
<b>Ryc. 29.</b> Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na zawartość TFV w próbkach śliny, n = 3.....	81
<b>Ryc. 30.</b> Stabilność TFV w ślinie (A) i supernatancie śliny (B) przechowywanych w temperaturze 36,6, 25, 4 i -20°C przez okres 300 min, n = 3.....	82
<b>Ryc. 31.</b> Stabilność TFV w próbce śliny po kilkukrotnym zamrażaniu i rozmrożeniu odpowiednio w temperaturze -20°C i 4 °C, n = 3. ....	84
<b>Ryc. 32.</b> Krzywa kalibracyjna uzyskana dla próbek śliny wzbogaconych TFV, n = 3. .	85
<b>Ryc. 33.</b> Chromatogramy otrzymane dla próbek: śliny pochodzącej od osoby zdrowej, śliny wzbogaconej TFV o stężeniu 8 µg ml <sup>-1</sup> oraz śliny pacjentki przyjmującej TFV w postaci leku Viread w dawce 123 mg. Warunki HPLC: kolumna ZORBAX SB C-18 (150×4,6 mm, 5 µm), elucja izokratyczna: 3% MeCN i 97% PB (0,015 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,4),	

temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1 ml min <sup>-1</sup> .....	86
<b>Ryc. 34.</b> Widmo ENT zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej.....	88
<b>Ryc. 35.</b> Wykres zależności wysokości pików ENT od objętościowej prędkości przepływu fazy ruchomej dla kolumny LiChrosorb RP-18, n = 3. ....	89
<b>Ryc. 36.</b> Wykresy zależności wpływu stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	90
<b>Ryc. 37.</b> Wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	91
<b>Ryc. 38.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	91
<b>Ryc. 39.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czas retencji pików Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	92
<b>Ryc. 40.</b> Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia Crn w próbce moczu, n = 3. ....	93
<b>Ryc. 41.</b> Krzywa kalibracyjna dla ENT sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w próbce moczu, n = 3. ....	94
<b>Ryc. 42.</b> Chromatogramy otrzymane dla standardu ENT, próbki moczu zdrowego ochotnika oraz moczu wzbogaconego Crn i ENT odpowiednio o stężeniach 200 μmol ml <sup>-1</sup> i 75 μg ml <sup>-1</sup> . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 μm), elucja gradientowa: 0-2 min 4-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN, 4-7 min 8-4% MeCN i od 7-10 min 4% MeCN, PB (0,01 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,8), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,5 ml min <sup>-1</sup> . ....	96
<b>Ryc. 43.</b> Wykresy zależności wpływu stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni pików pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	98
<b>Ryc. 44.</b> Wpływ stężenia PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	98
<b>Ryc. 45.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	99
<b>Ryc. 46.</b> Wpływ pH PB zawartego w fazie ruchomej na czasy retencji sygnałów pochodzących od Crn (A) i ENT (B), n = 3.....	99
<b>Ryc. 47.</b> Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na pole powierzchni sygnałów Crn (A) i ENT (B) w próbkach osocza krwi człowieka, n = 3. ....	101
<b>Ryc. 48.</b> Krzywa kalibracyjna dla Crn sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia Crn w próbce osocza, n = 3.....	102

<b>Ryc. 49.</b> Krzywa kalibracyjna dla ENT sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w próbce osocza, n = 3. ....	102
<b>Ryc. 50.</b> Chromatogramy: roztworu standardowego ENT, próbki osocza osoby zdrowej i osocza osoby zdrowej wzbogaconego Crn i ENT o stężeniach odpowiednio 0,2 µg ml <sup>-1</sup> i 20 µg ml <sup>-1</sup> . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 µm), elucja gradientowa: 0-2 min 3-8% MeCN, 2-4 min 8% MeCN i 4-7 min 8-3% MeCN, PB (0,01 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,8), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,5 ml min <sup>-1</sup> . ....	104
<b>Ryc. 51.</b> Wpływ objętości odczynnika strącającego białko na zawartość ENT w próbkach śliny, n = 3. ....	106
<b>Ryc. 52.</b> Krzywa kalibracyjna uzyskana dla próbek śliny wzbogaconej ENT, n = 3. ....	107
<b>Ryc. 53.</b> Chromatogramy otrzymane dla próbki śliny zdrowego ochotnika oraz śliny wzbogaconej standardem ENT o stężeniu 8 µg ml <sup>-1</sup> . Warunki HPLC: kolumna LiChrosorb RP-18 (250 mm × 4,6 mm, 10 µm), elucja gradientowa: 0-2 min 7-10% MeCN, 2-4 min 10% MeCN, 4-5 min 10-7% MeCN, PB (0,01 mol l <sup>-1</sup> , pH 7,8), temperatura kolumny 25°C, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,5 ml min <sup>-1</sup> . ....	108
<b>Ryc. 54.</b> Widma wzbudzenia (A) i emisji (B) ENT zarejestrowane w czasie analizy chromatograficznej. Warunki HPLC: PolymerX (150 × 4,6 mm, 5 µm), elucja izokratyczna, faza ruchoma: MeCN (10%) i 1% kwas octowy (90%), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej 1,0 ml min <sup>-1</sup> , temperatura kolumny 25°C. ....	110
<b>Ryc. 55.</b> Wpływ stężenia kwasu octowego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu octowego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT, n = 3. ....	111
<b>Ryc. 56.</b> Wpływ stężenia kwasu trichlorooctowego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu trichlorooctowego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT, n = 3. ....	112
<b>Ryc. 57.</b> Wpływ stężenia kwasu solnego zawartego w fazie ruchomej na pole powierzchni (A) i czas retencji (B) pików ENT oraz pH kwasu solnego na pole powierzchni (C) i czas retencji (D) pików ENT, n = 3. ....	113
<b>Ryc. 58.</b> Stabilność ENT w moczu o różnym pH przechowywanym w temperaturze 36,6, 25, 4 i -20°C przez okres 300 min, n = 3. ....	115
<b>Ryc. 59.</b> Trwałość ENT w próbce moczu po kilkukrotnym zamrażaniu w temperaturze 20°C i rozmrożeniu w 4°C, n = 3. ....	116
<b>Ryc. 60.</b> Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od stężenia ENT w moczu, n = 3. ....	116



- Ryc. 61.** Chromatogramy otrzymane dla próbki moczu zdrowego ochotnika bez wzbogacenia oraz moczu wzbogaconego ENT o stężeniu  $80 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), elucja izokratyczna, faza ruchoma: 1% roztwór TCA (88%) oraz MeOH (12%), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ . ..... 118
- Ryc. 62.** Chromatogramy próbki osocza od zdrowego ochotnika i osocza wzbogaconego ENT o stężeniu  $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), faza ruchoma to 0,1% HCl i MeOH, elucja gradientowa: 0–1 min, 20% (MeOH); 1–3 min, 20–40% (MeOH); 3–5 min 40–20% (MeOH); 5–7 min 20% (MeOH), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ . ..... 119
- Ryc. 63.** Chromatogram próbki śliny od zdrowego ochotnika i śliny wzbogaconej ENT o stężeniu  $0,8 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Warunki HPLC: kolumna PolymerX ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ ), faza ruchoma to 0,1% HCl i MeOH, elucja gradientowa: 0–1 min, 20% (MeOH); 1–3 min, 20–40% (MeOH); 3–5 min 40–20% (MeOH); 5–7 min 20% (MeOH), objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ . ..... 120
- Ryc. 64.** Wpływ objętości odczynnika strącającego na pole powierzchni sygnału ENT w próbkach osocza krwi (A) oraz śliny (B),  $n = 3$ . ..... 121
- Ryc. 65.** Stabilność ENT w osoczu (A) i supernatancie osocza (B) przechowywanym w temperaturze  $36,6$ ,  $25$ ,  $4$  i  $-20^\circ\text{C}$  przez okres 300 min,  $n = 3$ . ..... 122
- Ryc. 66.** Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od zawartości ENT w osoczu,  $n = 3$ . ..... 123
- Ryc. 67.** Krzywa kalibracyjna sporządzona na podstawie zależności pola powierzchni pików od zawartości ENT w próbkach śliny,  $n = 3$ . ..... 123
- Ryc. 68.** Przykładowy wynik analizy standardu TFV dla kolumny Kinetex HILIC ( $100 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $2,6 \mu\text{m}$ ). Pozostałe warunki HPLC: faza ruchoma PB ( $0,02 \text{ mol l}^{-1}$  pH 2,7), MeCN, elucja gradientowa: 0–5 min 80–50% MeCN, 5–10 min 50–80% MeCN, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $1 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ . ..... 128
- Ryc. 69.** Przykładowy wynik analizy standardu TFV dla kolumny Poroshell ( $75 \times 4,6 \text{ mm}$ ,  $2,7 \mu\text{m}$ ). Pozostałe warunki HPLC: faza ruchoma MeOH, (PB  $0,01 \text{ mol l}^{-1}$  pH 6,8), elucja gradientowa: 0–5 min 8–15% MeOH, 5–10 min 15–8% MeOH, objętościowa prędkość przepływu fazy ruchomej  $0,8 \text{ ml min}^{-1}$ , temperatura kolumny  $25^\circ\text{C}$ . ..... 128

## SPIS TABEL

<b>Tabela 1.</b> Przykłady zatwierdzonych leków przeciwretrowirusowych [26].	18
<b>Tabela 2.</b> Charakterystyczne parametry moczu zdrowego człowieka [71,73].	27
<b>Tabela 3.</b> Podział i charakterystyka morfotycznych elementów krwi [81].	30
<b>Tabela 4.</b> Kolorowe oznaczenia odpowiadające międzynarodowym standardom [92].	33
<b>Tabela 5.</b> Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania TFV w próbkach osocza.	40
<b>Tabela 6.</b> Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania TFV w próbkach moczu i śliny.	43
<b>Tabela 7.</b> Wybrane warunki chromatograficzne i parametry walidacji metod oznaczania ENT w próbkach biologicznych i preparatach farmaceutycznych.	47
<b>Tabela 8.</b> Wyniki procedury walidacyjnej metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach moczu, n=3 [142].	65
<b>Tabela 9.</b> Wyniki precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej otrzymane dla próbek moczu wzbogaconego TFV, n= 3 [142].	67
<b>Tabela 10.</b> Farmakokinetyka TFV wydalanego z moczem po przyjęciu leku w dawce 123 mg (pacjent 1) i 245 mg (pacjent 2 i 3), n= 3.	68
<b>Tabela 11.</b> Wyniki walidacji metody jednoczesnego oznaczania TFV i Crn w próbkach osocza, n = 3 [142].	78
<b>Tabela 12.</b> Wyniki uzyskane dla badania precyzji i dokładności wewnątrz- i między-dniowej uzyskane dla próbek osocza wzbogaconego TFV, n = 3 [142].	79
<b>Tabela 13.</b> Wyniki walidacji metody oznaczania TFV w próbkach śliny, n = 3.	85
<b>Tabela 14.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania TFV w ślinie, n = 3.	85
<b>Tabela 15.</b> Wyniki walidacji metody oznaczania Crn i ENT w próbkach moczu, n= 3.	94
<b>Tabela 16.</b> Precyzja i dokładność wewnątrz- i między-dniowa metody oznaczania Crn i ENT w moczu, n=3.	95
<b>Tabela 17.</b> Wyniki procedury walidacyjnej metody oznaczania Crn i ENT w próbkach osocza, n = 3.	103
<b>Tabela 18.</b> Precyzja i dokładność wewnątrz- i między-dniowa metody oznaczania Crn i ENT w osoczu, n = 3.	103
<b>Tabela 19.</b> Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w próbkach śliny, n = 3.	107
<b>Tabela 20.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania ENT w ślinie, n = 3.	107

<b>Tabela 21.</b> Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w próbkach moczu, n = 3.....	117
<b>Tabela 22.</b> Precyzja i dokładność metody oznaczania ENT w moczu, n = 3. ....	117
<b>Tabela 23.</b> Wyniki walidacji metody oznaczania ENT w osoczu i ślinie, n = 3. ....	124
<b>Tabela 24.</b> Dane walidacyjne dotyczące precyzji oraz dokładności dla próbek osocza i śliny (między-dniowej, wewnątrz-dniowej). ....	124
<b>Tabela 25.</b> Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w moczu. ....	130
<b>Tabela 26.</b> Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w osoczu. ....	135
<b>Tabela 27.</b> Zestawienie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania TFV w ślinie. ....	138
<b>Tabela 28.</b> Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT w próbkach osocza. ....	141
<b>Tabela 29.</b> Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT opracowanych dla dwóch różnych sposobów detekcji. ....	144
<b>Tabela 30.</b> Porównanie wybranych parametrów walidacyjnych metod oznaczania ENT opracowanych dla próbek osocza i śliny. ....	146

## STRESZCZENIE

Zdrowie człowieka i długość jego życia są zależne od środowiska, w którym żyje, stylu życia oraz poziomu opieki medycznej. Nieodpowiednie zachowania seksualne oraz bezpośrednie narażenie na patogeny przenoszone drogą krwi, w tym bardzo niebezpieczne zakażenia wirusami HIV i HBV, przyczyniają się do cierpienia i śmierci milionów ludzi na całym świecie.

Powyższa rozprawa doktorska złożona jest z dwóch głównych części. W pierwszej z nich zawarto podstawowe informacje na temat badanych związków tj. kreatynina, tenofowir i entekawir, a także zamieszczono krótką charakterystykę matryc biologicznych wykorzystywanych do badań. Dokonano przeglądu literaturowego dotyczącego oznaczania tenofowiru w próbkach moczu, osocza oraz śliny i metod dedykowanych do oznaczania entekawiru w preparatach farmaceutycznych i osoczu wykorzystujących technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

W części drugiej przedstawiono opis badań własnych, dyskusję wyników, podsumowanie i wnioski. W części tej zestawiono informacje na temat wykorzystywanych odczynników, stosowanej aparatury oraz pozyskanego materiału do badań. Zaprezentowano również wyniki uzyskane w trakcie prowadzenia analiz z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z detekcją spektrofotometryczną oraz spektrofluorymetryczną. Informacje zawarte w tym fragmencie pracy dotyczą przebiegu procesów optymalizacji i walidacji nowych metod oznaczania tenofowiru, entekawiru i kreatyniny w próbkach moczu, osocza oraz śliny. Część eksperymentalna zakończona jest dyskusją otrzymanych wyników, ich podsumowaniem i wnioskami. Końcowy element pracy stanowią spis cytowanej literatury oraz dorobek autorki.

## **SUMMARY**

Human health and the length of life are dependent on the environment, lifestyle and level of medical care. Inappropriate sexual behavior and direct exposure to blood-borne pathogens, including very dangerous infections such as HIV and HBV, contribute to the suffering and death of millions of people around the world.

The doctoral dissertation consists of two main sections. The first one provides information on the tested compounds, i.e. creatinine, tenofovir, and entecavir as well as a short description of the biological matrices used for research. A literature review was carried out on the determination of tenofovir in urine, plasma and saliva samples. Methods dedicated to the determination of entecavir in pharmaceutical preparations and plasma using the technique of high-performance liquid chromatography were reviewed.

The second part presents a description of own research, a discussion of the results, a summary and conclusions. This section summarizes information on the reagents and the equipment used for the study, and the biological material obtained for testing. The results obtained during analyzes using the technique of high-performance liquid chromatography coupled with spectrophotometric and spectrofluorimetric detection were also presented. The information contained in this part of the work concerns the optimization and validation of new methods for the determination of tenofovir, entecavir and creatinine in urine, plasma and saliva samples. The experimental part ends with a discussion of the obtained results, their summary and conclusions. The final element of the work is a list of cited literature and the author's achievements.

## DOROBEK NAUKOWY

### Publikacje naukowe:

- A. Kamińska, P. Olejarz, K. Borowczyk, R. Głowacki, G. Chwatko, *Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC*. Journal of Separation Science. 2018, 41(16), 3241-3249.
- K. Borowczyk, P. Olejarz, A. Kamińska, R. Głowacki, G. Chwatko, *Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*. International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20(13), 3340.
- K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko, *Application of simultaneous separation and derivatization for the determination of  $\alpha$ -lipoic acid in urine samples by high performance liquid chromatography with spectrofluorimetric detection*. Biomedical Chromatography. 2019, 33(9), 4576.
- K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko, M. Szyłberg, R. Głowacki, *A Simplified Method for Simultaneous Determination of  $\alpha$ -Lipoic Acid and Low-Molecular-Mass Thiols in Human Plasma*. International Journal of Molecular Sciences. 2020, 21(3), 1049.
- B. Burnat, P. Olejarz, D. Batory, M. Cichomski, M. Kamińska, D. Bociaga, *Titanium Dioxide Coatings Doubly-Doped with Ca and Ag Ions as Corrosion Resistant, Biocompatible, and Bioactive Materials for Medical Applications*. Coatings. 2020, 10(2), 169.
- K. Purgat, P. Olejarz, I. Kośka, R. Głowacki, P. Kubalczyk, *Determination of homocysteine thiolactone in human urine by capillary zone electrophoresis and single drop microextraction*. Analytical Biochemistry. 2020, 596, 113640.
- P. Olejarz, G. Chwatko, P. Kubalczyk, K. Purgat, R. Głowacki, K. Borowczyk, *Application of high performance liquid chromatography for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human urine and plasma samples*. Pharmaceuticals 2020, 13, 367.

### Zgłoszenie patentowe:

- P.423653 z dn. 30.11.2017 r. Współtwórca zgłoszenia patentowego zatytułowanego „Sposób jednoczesnego wykrywania kwasu ( $\{(2R)\text{-}1\text{-}(6\text{-amino-}9\text{H-puryn-}9\text{-ylo)propan-}2\text{-ylo}\}$ oksy)metylo) fosfonowego i kreatyniny (2-imino-1-

metyloimidazolidyn-4-on) oraz test do wykrywania kwasu (2R)-1-(6-amino-9H-puryn-9-yl)propan-2-yl]oxy) metylofosfonowego w moczu i jednoczesnej wstępnej oceny funkcjonowania nerek”.

**Komunikaty konferencyjne – referaty:**

- 30.06.2017, Toruń, Polska, XI Copernican International Young Scientists Conference, The chemical derivatization in high performance liquid chromatography, A. Kamińska, P. Olejarz, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 15.09.2017, Chorzów, Polska, Pomędzy Naukami - Ogólnopolska konferencja młodych naukowców, Wykorzystanie derywatyzacji w kolumnie do oznaczania metioniny i homocysteiny w homogenatach mózgu, A. Kamińska, K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko,
- 01 – 05.07.2018, Lublin, Polska, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Oznaczanie tenofoviru i kreatyniny w próbkach moczu techniką chromatografii cieczowej, P. Olejarz, G. Chwatko, P. Kubalczyk, R. Głowacki, K. Borowczyk,
- 01 – 05.07.2018, Lublin, Polska, X Polska Konferencja Chemii Analitycznej, Rola przygotowania próbki biologicznej w kontekście analizy chromatograficznej, G. Chwatko, A. Kamińska, P. Olejarz, K. Borowczyk,
- 15-18.09.2019, Łódź, Polska. 25th International Symposium on Separation Sciences, The use of light-cured nail polish on nail plates conditions chromatographic studies, P. Olejarz, K. Frączak, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Borowczyk,
- 15-18.09.2019, Łódź, Polska. 25th International Symposium on Separation Sciences, The simplified method for simultaneous determination of  $\alpha$ -lipoic acid and low-molecular-mass thiols in human plasma, K. Borowczyk, P. Olejarz, G. Chwatko.

**Komunikaty konferencyjne – plakaty:**

- 11 – 12.05.2017, Łódź, Polska V Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, Derywatyzacja w kolumnie jako narzędzie do oznaczania N-acetylocysteiny w próbkach moczu, P. Olejarz, K. Wyka, R. Głowacki, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 10 – 13.09.2017, Sopot, Polska 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase- Separation Techniques (ITP. 2017) and 11th Polish Conference on Chromatography (PKChrom 2017), On-column derivatization with

o-phthaldialdehyde for fast determination of N-acetylcysteine and glutathione in brain tissues, P. Olejarz, R. Głowacki, K. Borowczyk, G. Chwatko, A. Kamińska, P. Kubalczyk,

- 10 – 13.09.2017, Sopot, Polska, 24th International Symposium on Electro- and Liquid Phase-Separation Techniques (ITP. 2017) and 11th Polish Conference on Chromatography (PKChrom 2017), Determination of thiols in brain homogenates by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet detection, G. Chwatko, A. Kamińska, P. Olejarz, M.J. Krawczyk-Walach, P. Kubalczyk, K. Borowczyk,
- 15.09.2017, Chorzów, Polska, Pomiedzy Naukami - Ogólnopolska konferencja młodych naukowców, Narzędzia analityczne wykorzystywane do ilościowego oznaczania kwasu liponowego w matrycach biologicznych, P. Olejarz, R. Głowacki, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 19 – 22.06.2018, Szczyrk, Polska, 41st Symposium Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds, A simplified method for the determination of lipoic acid other thiol amino acids in human plasma, P. Olejarz, G. Chwatko, R. Głowacki, K. Borowczyk,
- 30.08 – 01.09. 2018,. Brasov, Rumunia, New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, A novel, fast and simple method based on on-column derivatization for the determination of lipoic acid in urine samples, P. Olejarz, A. Kamińska, R. Głowacki, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 30.08 – 01.09. 2018, Brasov, Rumunia, New Trends on Sensing- Monitoring- Telediagnosis for Life Sciences, Determination of lipoic acid and lipoyllysine in plant tissues, A. Kamińska, P. Olejarz, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 10-11.12.2018, Kraków, Polska, XXIII Konferencja Nowoczesne metody instrumentalne w analizie śladowej, Oznaczanie wybranych związków siarczki w produktach spożywczych techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej, A. Kamińska, P. Olejarz, K. Borowczyk, G. Chwatko,
- 09-10.05.2019 Łódź, Polska, VII Łódzkie Sympozjum Doktorantów Chemii, A simple method for simultaneous determination of tenofovir and creatinine in human plasma and its application to toxicity monitoring. P. Olejarz, K. Borowczyk, G. Chwatko,



- 15-18.09.2019, Łódź, Polska. 25th International Symposium on Separation Sciences, Modern methods for the determination of selected antiviral drugs in HIV/HBV therapy, P. Olejarz, G. Chwatko, K. Borowczyk.

**Projekty badawcze:**

**2017 r.** - Wykonawca projektu zatytułowanego „Wykorzystanie technik separacyjnych do oznaczania biologicznie aktywnych związków w preparatach farmaceutycznych i próbkach biologicznych. Analizy wybranych związków aktywnych biologicznie” Grant przyznany z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, grant nr. (B1711100001599.02).

**2018 r.** - Wykonawca projektu zatytułowanego „Wykorzystanie technik separacyjnych w analizie wybranych związków aktywnych biologicznie” Grant przyznany z dofinansowania prac badawczych młodych naukowców Wydziału Chemii Uniwersytetu Łódzkiego, grant nr. (B1811100001857.02).

**Nagrody i stypendia:**

- Zespołowa Nagroda Dziekana I-go stopnia za publikację naukową Wydziału Chemii w roku 2019 K. Borowczyk, P. Olejarz, A. Kamińska, R. Głowacki, G. Chwatko, „*Application of butylamine as a conjugative reagent to on-column derivatization for the determination of antioxidant amino acids in brain tissue, plasma, and urine samples*”. International Journal of Molecular Sciences. 2019, 20(13), 3340.
- Zespołowa Nagroda Rektora UŁ I-go stopnia za osiągnięcia naukowo-badawcze w roku 2021.
- Stypendium doktoranckie z dotacji projakościowej na rok akademicki 2017/2018, 2018/2019, 2019/2020, 2020/2021.
- Stypendium Rektora Uniwersytetu Łódzkiego dla najlepszych doktorantów na rok akademicki 2018/2019.

**Inne:**

- Udział w warsztatach zatytułowanych „Introduction to design of experiments” w ramach 41 Symposium Chromatographic Methods of Investigating Organic Compounds.

- Wyjazd w ramach programu CEEPUS na 16-dniowy staż do Rumunii, „Transilvania” University of Brasov, Faculty of Medicine w terminie (24.08.2018 – 09.09. 2018r.).
- Uczestnictwo w szkole letniej zatytułowanej „Food safety and healthy living” w Brasov (Rumunia) (26 – 30.08. 2018r.).
- Udział w szkoleniu zatytułowanym „Najnowsze rozwiązania technologiczne dla chemii analitycznej” Łódź, 9.10.2018r.
- Udział w Komitecie organizacyjnym VII Łódzkiego Sympozjum Doktorantów Chemii, 9-10 maja 2019r.
- Udział w organizowaniu konferencji 25th International Symposium on Separation Sciences w dniach 15-18.09.2019r.