

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

**Extrakce amfetaminů a syntetických kationů
z mateřského mléka pomocí membránových
mikroextrakčních technik**

Rigorózní práce

Mgr. Šárka Zajíčková

Mgr. Hana Bavlovič Piskáčková, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Prohlášení autora:

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové dne

.....

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Haně Bavlovič Piskáčkové, Ph.D. za pomoc, rady a trpělivost v průběhu vedení mé rigorózní práce. Dále bych ráda poděkovala Úseku klinické a forenzní toxikologie v rámci Ústavu klinické biochemie a diagnostiky (ÚKBD), Fakultní nemocnice v Hradci Králové a dále Mgr. Alžbětě Nemeškalové a celé laboratoři forenzní analýzy biologicky aktivních látek, VŠCHT v Praze za poskytnutí potřebných materiálů pro experimentální část rigorózní práce. Na závěr bych ráda poděkovala své rodině za nejen psychickou podporu.

Obsah

Abstrakt.....	7
Abstract.....	8
Seznam použitých zkratk	9
1 Úvod.....	11
2 Teoretická část	13
2.1 Psychostimulační látky	13
2.1.1 Chemická struktura ATsS	13
2.1.2 Farmakokinetika a farmakodynamika ATsS	15
2.1.3 Typy vzorků.....	16
2.1.4 Stanovení amfetaminových sloučenin	18
2.2 Kapalinová chromatografie	18
2.2.1 Stacionární fáze.....	20
2.3 Hmotnostní spektrometrie	21
2.3.1 Ionizační techniky	22
2.3.2 Analyzátoři	25
2.3.3 Detekce	27
2.3.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie.....	27
2.4 Spojení LC-MS.....	28
2.5 Interpretace a kvantifikace výsledků	28
2.6 Úprava vzorků	30
2.7 Mikroextrakce odvozené od LLE	32
2.7.1 Extrakce do jediné kapky rozpouštědla	32
2.7.2 Mikroextrakce do kapalné fáze pomocí dutého vlákna	33
2.7.3 PALME	35
2.7.4 Elektromembránová extrakce	37

3	Cíle práce.....	39
4	Experimentální část	40
4.1	Chemikálie	40
4.2	Příprava roztoků a pufrů.....	40
4.3	Mateřské mléko	40
4.4	UHPLC-MS/MS.....	41
4.5	PALME	43
4.6	EME	44
4.7	Validace.....	44
4.7.1	Selektivita.....	45
4.7.2	Přesnost a preciznost	45
4.7.3	Výtěžnost.....	45
4.7.4	Linearita (kalibrační přímky)	45
4.7.5	Matricové efekty.....	45
4.7.6	Carry-over (přenos)	46
5	Výsledky a diskuze.....	46
5.1	UHPLC-MS/MS.....	46
5.2	Optimalizace PALME	48
5.2.1	Výběr SLM.....	48
5.2.2	Přídavek methanolu do donorové fáze	49
5.2.3	Zvýšení kyselosti akceptorové fáze.....	50
5.2.4	Doba extrakce	50
5.3	Optimalizace EME	51
5.3.1	Výběr SLM.....	51
5.3.2	Optimalizace napětí	52
5.3.3	Optimalizace času.....	53
5.4	Validace.....	53

5.4.1	Selektivita	53
5.4.2	Výtěžnost	54
5.4.3	Přesnost a preciznost.....	55
5.4.4	Linearita (kalibrační přímky).....	55
5.4.5	Matricové efekty	56
5.4.6	Carry-over efekt (přenos).....	57
5.5	Reálné vzorky a vzorky s neznámou koncentrací	57
6	Závěr	59
7	Seznam citované literatury.....	60

Abstrakt

Amfetamin stimulační látky (ATSs) představují širokou skupinu farmakologicky a toxikologicky účinných látek, které mají společný základ ve fenylethylaminové struktuře. Kromě omezeného farmakologického využití jsou díky svým psychostimulačním účinkům primárně zneužívány jako rekreační drogy. V současnosti představují druhou největší skupinu nelegálně užívaných drog na světě. Mezi hlavní představitele této skupiny řadíme amfetamin (AMF, speed), metamfetamin (MAMF, pervitin) a 3,4-methyldioxy-N-metamfetamin (MDMA, extáze). Rovněž sem můžeme zařadit i syntetické katinony, které zároveň patří do skupiny nových psychoaktivních látek (NPS), jež jsou primárně syntetizovány za účelem obejít zákon, protože často nejsou uvedeny v seznamu zakázaných látek. Všechny tyto sloučeniny mají relativně nízkou molekulovou hmotnost a slabě bazický charakter, což jim umožňuje širokou distribuci do tkání a biologických tekutin, a to včetně placenty plodu i mateřského mléka. Z těchto důvodů je v relevantních případech nutné zjistit, zda není novorozenec exponován těmito látkami, k čemuž může mimo jiné sloužit i analýza mateřského mléka (MM). Vzhledem k tomu, že MM je velmi komplexní a variabilní matrice obsahující velké množství interferujících látek, je před vlastní analýzou potřeba úprava vzorků. V souvislosti s určitými nevýhodami konvenčních metod pro úpravu vzorků je v posledních desetiletích významným trendem jejich miniaturizace. Cílem této práce bylo vyvinout mikroextrakční metody pro izolaci amfetaminů a vybraných katinonů z mateřského mléka. Zaměřili jsme se na mikroextrakční metody odvozené od extrakce z kapaliny do kapaliny, a to elektromembránovou extrakci (EME) a paralelní mikroextrakci pomocí kapalných membrán (PALME z anglického „parallel artificial liquid membrane extraction“). Tyto metody byly pro extrakci těchto látek z MM testovány vůbec poprvé. Pro analýzu extrahovaných vzorků byla použita metoda UHPLC-MS/MS s ionizací elektrosprejem v pozitivním módu, pro separaci byla použita kolona Luna Omega Polar a optimální separace bylo dosaženo s mobilní fází tvořenou směsí A 0,1% kyseliny mravenčí a B acetonitrilu v gradientovém módu. U obou extrakčních metod byl optimalizován výběr SLM, složení donorové i akceptorové fáze a délka extrakce. U EME byla navíc optimalizována i vhodná velikost vloženého napětí. Extrakční metody následované UHPLC-MS/MS byly úspěšně validovány a použity pro analýzu 6 reálných vzorků.

Abstract

Amphetamine-type stimulants (ATSs) refer to a group of pharmacological and toxicological agents that have a common phenethylamine structural backbone. In addition to their limited pharmacological use, they are primarily abused as recreational drugs due to their psychostimulant effects. They currently represent the second largest group of illicit used drugs in the world. The main representatives of this group include amphetamine (AMF, speed), methamphetamine (MAMF, pervitin) or 3,4-methylenedioxy-N-methamphetamine (MDMA, ecstasy). This ATSs also includes synthetic cathinones, which belong to the group of new psychoactive substances (NPS), which are primarily synthesized in order to circumvent the law, because they are often not included in the list of prohibited drugs. All of these compounds are low molecular weak bases which are widely distributed to tissues and biological fluids, including placenta and breast milk. For these reasons, it is necessary to determine exposure of newborn by these substances, in relevant cases. One of the way to detect this exposure is an analysis of breast milk (MM). Due to the fact that MM is a very complex and variable matrix which contain a large amount of fat and proteins, the pretreatment of the sample is necessary before the analysis. Due to some disadvantages of conventional sample pretreatment techniques, their miniaturization has been a significant trend in recent decades. The aim of this work was to develop microextraction techniques for the isolation of the amphetamines and selected cathinones from breast milk. We focused on microextraction techniques with basis in liquid-liquid extraction, namely electromembrane extraction (EME) and parallel artificial liquid membrane extraction (PALME). These techniques were applied for the isolation of ATSs from MM for the first time. UHPLC-MS/MS with electrospray ionization in positive mode was used for analysis of target analytes. For the separation was used a Luna Omega Polar column and mobile phase consisted from mixture of 0.1% formic acid (A) and acetonitrile (B) in gradient mode. For both microextraction techniques, the following parameters were optimized: organic solvents for SLM, composition and pH of donor and acceptor phases and extraction time. In addition, the electrical potential was optimized for EME. Extraction techniques followed by UHPLC-MS/MS were successfully validated and used for analysis of 6 real samples.

Seznam použitých zkratek

4-FMC	flefedron
ACN	acetonitril
AMF	amfetamin
APCI	chemická ionizace za atmosferického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosferického tlaku
ATS	amfetaminové sloučeniny
ATSs	amfetamin stimuluující látky
BUT	butylon
CE	kapilární elektroforeza
CNS	centrální nervový systém
DDA	dodecylacetát
DEHP	di(ethylhexyl)fosfát
DEHPi	bis(2-ethylhexyl)fosfit
DHE	dihexylether
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny
EMA	Evropská léková agentura (<i>European Medicines Agency</i>)
EME	elektromembránová extrakce
ESI	ionizace elektrosprejem
HF-LPME	mikroextrakce z kapaliny do kapaliny za pomoci dutého vlákná
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
HS	headspace
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC	kapalinová chromatografie
LIT	lineární iontová past
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	spodní limit kvantifikace
MAMF	metamfetamin
MDMA	3,4-methylendioxy-N-metamfetamin

MDPV	methylenedioxyprovaleron
ME	matricové efekty
MeOH	methanol
MEPH	mefedron
METH	methylon
MF	mobilní fáze
MM	mateřské mléko
MS	hmotnostní spektrometrie
MS _n	tandemová spektrometrie
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj
NPOE	2-nitrofenyl(oktyl)ether
NPS	nové psychoaktivní látky
PALME	paralelní mikroextrakce pomocí kapalných membrán
PP	proteinová precipitace
PVDF	polyvinylidenfluorid
Q	kvadrupól
RSD	relativní směrodatná odchylka
SDME	extrakce do jediné kapky rozpouštědla
SF	stacionární fáze
SIL	izotopicky značené vnitřní standardy („ <i>stable isotopically labelled</i> “)
SLM	<i>"supported liquid membrane"</i>
SPE	extrakce na tuhou fázi
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
SRM	skan vybraných reakcí
TOA	trioktylamin
TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Mateřské mléko (MM) představují vysoce komplexní variabilní biologickou tekutinu, která obsahuje velké množství proteinů, lipidů, sacharidů, vitamínů, minerálů a dalších látek pro tvorbu imunity novorozence. WHO doporučuje výlučné kojení po dobu prvních 6 měsíců od narození [1]. Kojení je spojeno se značnými zdravotními benefity pro dítě i matku, avšak složení daného MM mimo jiné závisí i na stravě matky. Mnoho substancí včetně léčiv i nelegálně užívaných látek může být vylučováno do MM, což může znamenat značné riziko pro kojence [2]. Obecně jsou ve vysoké míře do MM extrahovány látky s nízkou vazebností na plazmatické bílkoviny, s nízkou molekulovou hmotností, vysokou lipofilitou a nízkou hodnotou pH [2]. Mezi tyto látky patří mimo jiné i amfetaminy a jim strukturálně podobné látky (syntetické katinony), které mohou u kojence způsobovat poruchy chování, a dokonce byla zaznamenána i jeho smrt po expozici metamfetaminem [3].

Vzhledem k tomu, že jsou amfetaminové sloučeniny (ATS) v posledních letech řazeny mezi druhé nejužívanější nelegální látky na světě [4], je nutno v relevantních případech provést jejich detekci pro zjištění expozice těchto látek novorozenci, k čemuž může být mimo jiné využita i analýza mateřského mléka, jehož odběr je jednoduchý a neinvazivní [5]. Extrakce látek z této matrice představuje analytickou výzvu z důvodu vysokého obsahu lipidů a proteinů a variabilního složení v průběhu laktace [2].

Pro úpravu vzorků je možné použít běžné konvenční techniky, jako proteinovou precipitaci (PP) či extrakci na tuhou fázi (SPE), přičemž pro extrakci amfetaminů z MM se osvědčila extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) [1, 6].

Vzhledem k určitým nevýhodám těchto metod jsou pro jejich zjednodušení i zlepšení ekologického aspektu vyvíjeny jejich miniaturizované verze [2]. Pro izolaci sloučenin z MM bylo v minulosti použito několik mikroextrakčních technik, přičemž dominuje disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (DLLME) a mikroextrakce na tuhou fázi (SPME). Podle našich nejlepších znalostí nebyla dosud mikroextrakce amfetaminů z mateřského mléka publikována. Pro izolaci dalších nelegálních látek, jako např. kokain a jeho metabolity z MM byla použita technika mikroextrakce z kapaliny do kapaliny za pomoci dutého vlákna (HF-LPME) [2]. Tato technika byla dále modifikována na komerčně dostupný 96-jamkový formát (PALME), jenž umožňuje vysokou propustnost laboratoří a jeho rutinní užití. Tato multiformátová technika byla mimo jiné použita i pro extrakci nových psychoaktivních látek včetně několika

amfetaminových derivátů a syntetických katinonů z plazmy a plné krve [7]. Další alternativní mikroextrakční technikou je elektromembránová extrakce, která rovněž představuje modifikaci klasické HF-LPME metody, ale její princip založený na vloženém elektrickém poli je zcela odlišný od HF-LPME či PALME (pasivní difuze). Touto technikou byly mimo jiné izolovány amfetaminy z plazmy a byly zde zaznamenány výborné výtěžnosti [8].

V této studii byly pro izolaci amfetaminů a vybraných katinonů z mateřského mléka optimalizovány dvě mikroextrakční metody, PALME a EME v 96-jamkovém formátu. Obě metody následované UHPLC-MS/MS metodou byly validovány a aplikovány na analýzu 6 reálných vzorků MM.

2 Teoretická část

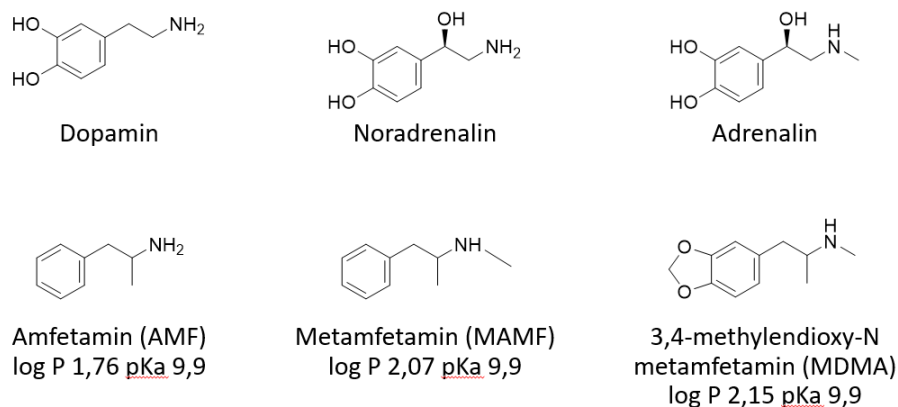
2.1 Psychostimulační látky

Amfetaminy nebo také amfetamin stimulační látky (ATSs) tvoří širokou skupinu farmakologicky a toxikologicky účinných látek, které mají společný základ ve fenylethylaminové struktuře. Mezi jejich typické účinky patří vazokonstrikce, anorexie, stimulace centrálního nervového systému (CNS) a/nebo halucinace. Jsou získávány chemickou syntézou a řadí se mezi tzv. sympatomimetické aminy. ATSs mají své terapeutické využití, ale častěji bývají zneužívány jako rekreační drogy. Po marihuaně jsou tyto stimulační látky druhou největší skupinou nelegálně užívaných drog na světě [9]. Mezi hlavní představitele této skupiny patří amfetamin (speed, AMF), metamfetamin (pervitin, MAMF) a 3,4-methylendioxy-N-metamfetamin (extáze, MDMA) [10, 11, 7, 12].

S cílem obejít zákony a předpisy se na trhu nelegálních látek objevují analogy tradičních drog, které nejsou uvedeny v seznamu zakázaných látek, a jsou tedy „legální“. Tyto látky jsou označovány jako tzv. nové psychoaktivní látky (NPS). Příkladem NPS jsou syntetické katinony, které vzhledem ke své struktuře mohou být řazeny také do skupiny ATSs [7, 13, 14, 15]. Evropské monitorovací centrum pro drogy a drogovou závislost (EMCDDA) ve své zprávě za rok 2019 uvádí, že syntetické katinony tvoří druhou největší skupinu nových psychoaktivních látek [14]. Nejčastěji jsou prodávány na internetu pod názvy jako koupelové soli, vonné tyčinky, rostlinná strava či výzkumné látky [16].

2.1.1 Chemická struktura ATSs

Jak je již zmíněno výše, struktura amfetaminových sloučenin je odvozena od fenylethylaminu. Strukturálně jsou si podobné s katecholaminovými neurotransmitery (adrenalin, noradrenalin, dopamin). Od těchto neurotransmiterů se liší absencí aromatických hydroxylových skupin viz Obrázek 1 [17, 18].

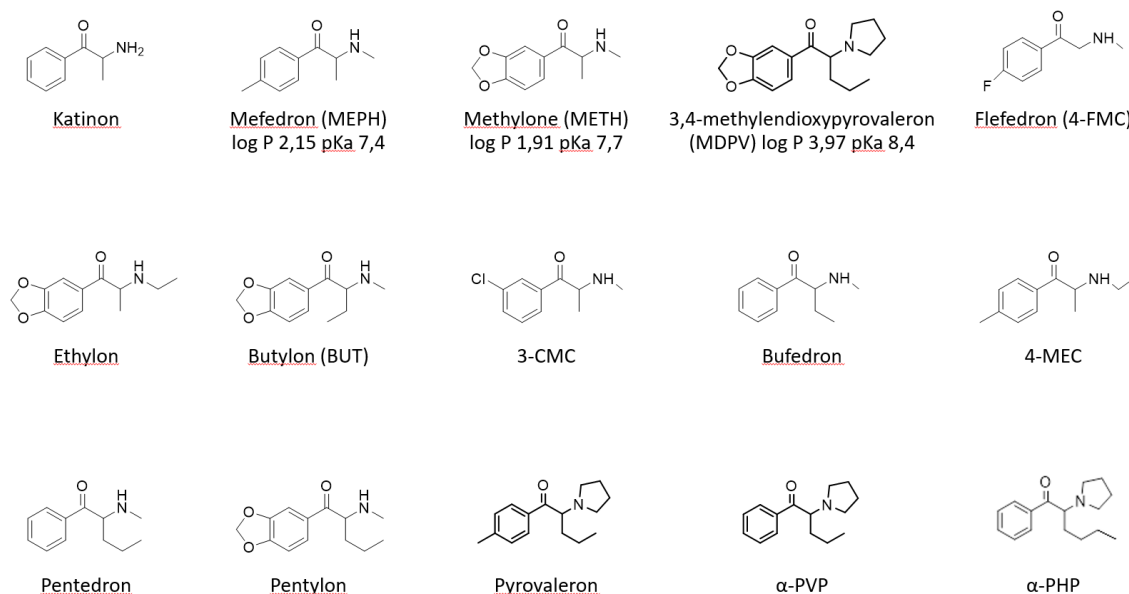


Obrázek 1: Chemické struktury neurotransmiterů a amfetaminů s vybranými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

Jsou to nízkomolekulární, lipofilní, slabě bazické sloučeniny s hodnotou pKa 9,9 [17]. Často se vyskytují v podobě solí (nejčastěji hydrochlorid či sulfát) [17].

Amfetaminy jsou chirální látky a jednotlivé enantiomery se obvykle liší v intenzitě účinku. Např. v případě MAMF jsou oba enantiomery agonisty CNS, nicméně L-metamfetamin má podstatně slabší a kratší účinek ve srovnání s D-metamfetaminem (cca 10 % účinků). Dokonce ve Spojených státech můžeme L-enantiomer nalézt ve volně prodejných nazálních dekongestantech (např. Vicks VapoInhlaer™) [17, 19, 20].

Strukturální základ syntetických katinonů tvoří monoaminový alkaloid katinon, který je nositel psychotropního účinku a je obsažen ve stálezelené rostlině *Catha edulis* [11]. Jsou to beta-keto fenylethylaminy, které jsou strukturálně podobné amfetaminům a katecholaminům [13, 21, 18], viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Chemické struktury katinonů. 3 nejčastější katinony (MEPH, METH a MDPV) s vybranými fyzikálně-chemickými vlastnostmi.

2.1.2 Farmakokinetika a farmakodynamika ATs

Absorpce amfetaminových sloučenin je dobrá u všech způsobů podání, jako je šňupání, kouření a orální či nitrožilní podání. Po orálním užití dosahují maximální plazmatické koncentrace za cca 2 hodiny [17]. Jsou eliminovány játry a ledvinami a okolo 40 procent je vylučováno v původní nezměněné formě. Překračují hematoencefalickou bariéru a jsou ve vysoké míře distribuovány do všech tkání a také do placenty plodu a mateřského mléka. Je uváděno, že koncentrace amfetaminů v mléce je mnohem vyšší než v matčině plazmě. V případě, že kojící žena užije MAMF, je dle studií o distribuci psychostimulačních látek [17,22] doporučeno vynechat kojení po dobu 24-48 hodin od podání. Existuje i případ, kdy byly v Kalifornii odsouzeny 2 matky za ohrožení dítěte podáváním metamfetaminu skrze mateřské mléko [23].

Mechanismus účinku amfetaminových sloučenin vychází ze strukturální podoby s monoaminovými neurotransmitery (dopamin, noradrenalin, serotonin). V periferním nervovém systému i v CNS působí jako nepřímí agonisté na monoaminergních receptorech a také inhibují metabolismus monoaminů, což má za následek zvýšení koncentrace těchto neurotransmiterů. Všechny amfetaminové sloučeniny mají podobný mechanismus účinku, ale v závislosti na jejich struktuře se liší mírou působení na jednotlivé neurotransmitery. AMF a MAMF působí více na dopaminové a noradrenalinové receptory, kdežto MDMA díky své substituci na fenylovém jádře působí více na serotoninové receptory [17].

Syntetické katinony rovněž působí na zvýšení mimobuněčné koncentrace monoaminových neurotransmiterů, ale v rámci skupiny katinonů se může jejich mechanismus účinku mírně lišit. Katinony se substitucí na fenylovém jádře jako je např. mefedron se chovají jako substráty monoaminových transportérů. Ty, které obsahují ve své struktuře pyrrolidin (např. MDPV), působí jako inhibitory transportérů, a tím blokuji zpětné vychytávání neurotransmiterů [13].

Amfetaminy i syntetické katinony způsobují v návaznosti na způsobu užití pocit zvýšené energie, zvýšené pozornosti, tvořivého myšlení, zvýšenou hovornost, euforii. Dochází ke zlepšení nálady, zvýšení sebevědomí a k celkovému zvýšení fyzické i psychické výkonnosti. Zvyšují sexuální touhu, snižují chuť k jídlu a potlačují únavu. Mají rovněž omezené využití v léčbě – při léčbě úrazu mozku, narkolepsie, chronického únavového syndromu a u poruch pozornosti u dětí (ADHD syndrom). V menší míře se používají i jako anorektika k potlačení hladu a snížení tělesné hmotnosti. Mezi off-label

užití patří léčba únavy u pacientů s rakovinou, léčba chronické bolesti a rovněž léčba dysforie/deprese v kombinaci s antidepresivy [11, 17, 24].

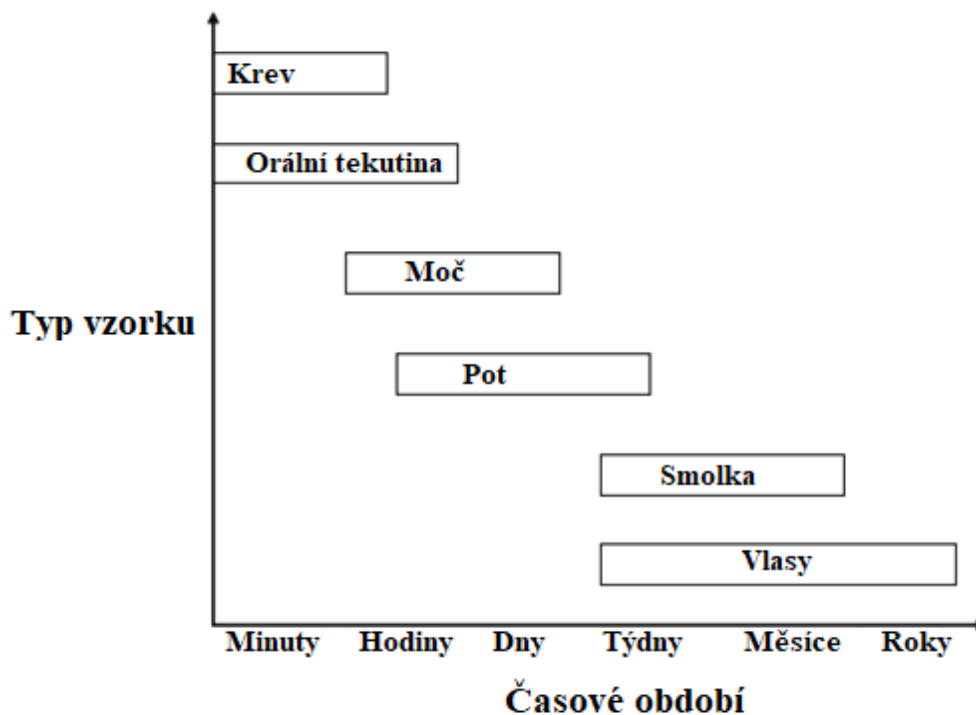
MDMA a některé jemu strukturálně podobné syntetické katinony vyvolávají méně psychostimulačních účinků a spíše se pohybují na pomezí stimulancí a psychedelik (halucinogenů). Způsobují zvýšenou míru empatie a nutkání po sociálním kontaktu (emocionálním i fyzickém). Proto jsou rovněž označovány jako tzv. empatogeny [11, 25].

Mezi nežádoucí účinky patří změna vnímání a chování, zejména podrážděnost, agresivita, neklid, paranoia a mohou se dostavit i závratě. Mezi další nežádoucí účinky řadíme hypertenzi, tachykardii, zvýšenou dechovou frekvenci, mydriázu a bolesti hlavy [11]. Dále vzniká vysoký stupeň psychické závislosti a s ní spojený abstinenci syndrom. Ve srovnání s užíváním tlumících látek CNS (heroin, sedativa-hypnotika) je mírnější.

Několik studií naznačuje, že užívání těchto látek v těhotenství může způsobit malformace plodu (rozštěp patra, pilonidální sinus, abnormality uší, urogenitální a srdeční anomálie), poruchy neurobehaviorálního vývoje, abnormality svalového tonu, zvýšenou nemocnost, potíže s krmením a nespavost. Dále mohou ATSS způsobit předčasný porod a nízkou porodní hmotnost novorozence [26, 15]. V nejhorším případě mohou způsobit i smrt plodu. Co se týče abstinenci příznaků u novorozenců matek užívajících psychostimulancia se může objevit extrémní podrážděnost, špatná technika sání a přítomnost příznaků autonomního stresu [21, 22]. Při podezření na užívání amfetaminů při kojení je vhodné tuto domněnku potvrdit, k čemuž slouží různé screeningové testy.

2.1.3 Typy vzorků

Amfetaminové sloučeniny je možné testovat v různém biologickém materiálu. Výběr konkrétní biologické matrice záleží na účelu analýzy, stejně jako na výhodách a limitacích, které každá matrice přináší. Jednotlivé typy vzorků se liší zejména mezi záchytu (tzv. časové detekční okno, viz Obrázek 3), které se různí od několika hodin až dnů (tělní tekutiny), přes měsíce (smolka) až roky (vlasy, nehty). Takto široká detekční okna mohou být použita mimo jiné i pro hodnocení gestační expozice dané látky [19, 27].



Obrázek 3: Přibližné detekční periody látek v různých biologických vzorcích. Převzato z: [19] a upraveno.

Užití alternativních biologických vzorků jako jsou vlasy, sliny, pot nebo mateřské mléko má oproti konvenčním typům vzorků (moč či krev) určité výhody. Jednoduchost odběru, která nevyžaduje odborného pracovníka, absence problémů souvisejících se ztrátou soukromí (při odběru moči) a snížený potenciál k falšování vzorků patří mezi hlavní z nich [28].

Vzhledem k tématu této práce budou dále diskutovány pouze dvě alternativní matrice, a to smolka a mateřské mléko.

Smolka

Smolka je první novorozenecká stolice, která je formována v plodu již mezi 12. a 16. týdnem těhotenství a většinou je vylučována 1 až 5 dní po narození [29]. Její analýza se používá ke zjištění prenatální expozice drog a poskytuje informaci o relativně dlouhé historii užívání daných látek v těhotenství [29, 30]. Smolka je tedy vzorkem první volby při zjišťování expozice látek *in utero*. Přestože odběr smolky je jednoduchý a neinvazivní, je její analýza, vzhledem k povaze matrice, podstatně složitější ve srovnání s biologickými tekutinami jako moč nebo krev. Mezi další nevýhody této matrice patří problémy s interpretací výsledků (nестandardizované cut off limity) [19, 31].

Mateřské mléko

Tato matrice obsahuje vysokou koncentraci tuků a bílkovin a její pH je nižší než pH plazmy (6,35 - 7,35) [30, 32]. Složení mateřského mléka se mění během laktace, tzv.

přední mléko (první 1/3) obsahuje nižší koncentraci tuků než tzv. zadní mléko (zbývající 2/3) [5]. Prvních pár dnů po porodu je produkováno tzv. mlezivo (kolostrum), což je krémově bílá až žlutá tekutina, která je bohatá na vitamíny, minerály a proteiny a zajišťuje pasivní imunitu novorozenci [29].

Mnoho látek užívaných matkou může přecházet do mateřského mléka. Koncentrují se v něm především látky o nízké molekulární hmotnosti charakterizované nízkou vazebností na bílkoviny v plazmě a vysokou lipofilitou. Do mléka rovněž přechází bazické molekuly, což je případ právě amfetaminových sloučenin [32]. Analýza této matrice tedy slouží zejména pro získání informace o aktuální expozici dané látky novorozenci. Výhodou je rovněž jednoduchý a neinvazivní odběr vzorku, nicméně vzhledem ke komplexnosti matrice je obvykle nezbytná jeho důkladná úprava před analýzou. Hlavní komplikací jsou zejména lipofilní složky mléka, které mohou způsobovat výrazné matricové efekty při detekci hmotnostním spektrometrem (MS) [29, 5].

2.1.4 Stanovení amfetaminových sloučenin

Stanovení amfetaminů můžeme rozdělit do 2 kategorií, a to screeningové testy a konfirmační metody. Screeningové testy jsou používány k prokázání přítomnosti amfetaminů ve vzorku. Ty jsou nejčastěji založené na principu imunoanalytických metod a poskytují nám informaci o celé skupině látek nikoliv o konkrétním amfetaminu. Následně se provádí konfirmační test, který slouží k identifikaci konkrétního amfetaminu a jeho kvantifikaci, k čemuž se nejčastěji využívají chromatografické metody. Hojně užívanou metodou pro stanovení amfetaminů je kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [33, 29, 30].

2.2 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (HPLC, LC) umožňuje separaci látek ve směsi na základě jejich rozdílné distribuci mezi dvěma fázemi (mobilní a stacionární), které jsou vzájemně nemísitelné. Mobilní fáze (kapalina, MF) unáší složky vzorku chromatografickou kolonou, která je naplněna fází stacionární (pevná látka, SF) [34].

Typický LC systém se skládá ze zásobníku mobilní fáze, odplyňovače pro odstranění bublinek rozpuštěných plynů z MF, vysokotlakého čerpadla, dávkovače vzorku, analytické kolony naplněné stacionární fází a detektoru. Běžně je celý systém napojen na počítač, který zároveň slouží ke sběru dat [30, 34].

Mobilní fáze je umístěná v **zásobních lahvích**, ve kterých jsou umístěny speciální filtry pro záchyt tuhých částic před vstupem do kolony. Složení MF může být buď konstantní po celou dobu analýzy (tzv. izokratická eluce) nebo se může měnit (tzv. gradientová eluce). V případě gradientové eluce jsou jednotlivé složky míseny ve směšovací zařízení dle výchozího nastavení. Tento směšovač může být umístěn před (jedním) vysokotlakým čerpadlem nebo za (dvěma) vysokotlakými čerpadly. Gradientová eluce zvyšuje v průběhu separace eluční sílu MF a umožňuje tak zkrátit dobu analýzy [34].

Transport MF je uskutečňován díky **vysokotlakému čerpadlu** (či čerpadlům). Dělíme je na pneumatická čerpadla, čerpadla injekčního typu, membránová, pístová či dvoupístová čerpadla, které v současnosti patří k nejpoužívanějším. Tato duální vysokotlaká pístová čerpadla jsou poháněna jedním motorem, kdy v průběhu plnění jedné části čerpadla, je kapalina vypuzována do systému druhou částí. Tímto se dosáhne téměř bezpulzního čerpání [34].

Vzorek, který je umístěn v **automatickém dávkovači** (autosampler) je automaticky nastříkovan do proudu MF, což je řízeno za pomoci šesticestného ventilu. Tyto automatické dávkovače jsou spojeny se zásobníkem vzorků, kde jsou umístěny vzorky ve vialkách uzavřených pryžovaným septem nebo perforovanou zátkou z polypropylenu. V případě malého objemu (desítky až stovky mikrolitrů) jsou ve vialkách ještě vloženy tzv. inzerty [34].

Vzorek je separován na chromatografické koloně, která se skládá z kovového pláště uzavřeného kovovou porézní fritou a ze stacionární fáze, přičemž oba její konce jsou zakončeny převlečným ochranným kroužkem a z koncové hlavice, ve které je otvor pro kapiláru s hydraulickou spojkou. Tato kapilára slouží k propojení kolony s dávkovačem a detektorem. V současné době jsou nejčastěji používány kolony z nerezové oceli o rozměrech 50 – 250 mm × 2,1 – 4,6 mm s průměrnou velikostí částic 1,7 – 5 μm [30].

Kolona je umístěna v kolonovém prostoru, jehož součástí je termostat, který zajišťuje rovnoměrnou distribuci teploty v celém instrumentu, a tím zabraňuje teplotním výkyvům během analýzy [34].

Jednotlivé složky vzorku jsou na koloně **separovány** na základě různé afinity ke stacionární fázi. Během separace probíhá opakující se ustalování rovnováhy dělených látek mezi MF a SF. Je nutné zvolit vhodný typ stacionární fáze, který bude dostatečně interagovat se vzorkem [34].

Po vlastní separaci je vzorek unášen na **detektor**. V toxikologii je nejčastěji využíván spektrofotometrický (UV), fluorescenční a MS detektor, který bude zmíněn v samostatné kapitole 2.3 [30, 34].

Existuje řada **módů kapalinové chromatografie** dle mechanismu interakce analytu se stacionární fází, a to chromatografie na normálních fázích, na reverzních fázích, iontově-výměnná chromatografie, vylučovací chromatografie, iontově-párová chromatografie. Jednotlivé stacionární fáze mohou být rozděleny dle těchto módů na normální, reverzní, ionxy, gely, chirální fáze a další. Toto rozdělení není však dostačující, jelikož mnoho fází může pracovat ve vícero módech. Správnější členění je dle jejich chemického složení, kterému je věnována následující kapitola [34].

2.2.1 Stacionární fáze

Nejčastěji jsou využívány částicové kolony, kde jsou jednotlivé částice tvořeny např. silikagelem, oxidy kovů (nejčastěji oxid zirkoničitý), polymery atd. Částice mohou být buď plně porézní nebo mohou mít pevné jádro, které je obaleno porézním sorbentem (tzv. core-shell), jež generuje nižší zpětný tlak. Dalšími jsou kolony monolytické, které jsou tvořeny jedním kusem pórovitého materiálu, který vyplňuje celou vnitřní část kolony [35, 36, 37].

Silikagel je nejrozšířenějším polárním anorganickým sorbentem. Je levný, relativně stabilní, inertní a má dobrou mechanickou stabilitu. Navíc je dostupný v různých velikostech částic s rozličnou distribucí. Na povrchu silikagelu jsou silanolové (hydroxylové) skupiny, díky kterým má polární, slabě kyselý charakter. Tyto skupiny jsou aktivními centry a díky své reaktivitě je lze snadno chemicky modifikovat, čehož se využívá při separaci na reverzních fázích. V tomto případě je na silanolové skupiny nejčastěji navázán oktadecyl (C18), dále např. fenylyl, oktylyl, alkylfenyl, difenyl. Mohou být navázány i středně polární substituenty (nitro-, kyano-, amino- skupiny apod.), které mohou být použity pro separaci na normálních i reverzních fázích, případně i v módu hydrofilní interakční chromatografie (HILIC) [34, 38].

Vzhledem ke slabě kyselému charakteru povrchu jsou ve větší míře zadržovány bazické látky, což může způsobovat nárůst retenčního času a tzv. chvostování píků. Stabilita silikagelových stacionárních fází je obvykle limitovaná rozsahem pH, kdy při hodnotě nižší než 3 dochází k hydrolyze siloxanových skupin, a naopak při hodnotě vyšší než 7 dochází k rozpouštění silikagelu. Další limitací v případě reverzních fází je použití čistě vodných MF. Při separaci polárních látek je vyžadováno, aby eluční síla MF byla

minimální, a nedocházelo tak k příliš rychlé eluci těchto látek. Toto však není kompatibilní s klasickými C18 reverzními fázemi. Hydrofobní řetězce nemohou být díky velkému rozdílu v polaritě dostatečně smáčeny a může dojít až ke zhroucení C18 řetězců (tzv. hydrofobní kolaps), čímž se naruší funkce SF. Pro použití 100% vodných MF je řešením vhodná modifikace SF (vlození krátkých či dlouhých alkylových řetězců, vložení polárních substituentů, zvětšení průměru pórů stacionární fáze či použití hydrofilní polárně endcappované stacionární fáze). Endcapping je fyzikálně chemický proces, kterým jsou redukovány volné silanolové skupiny. Zaslepení těchto skupin je provedeno chemickou reakcí s některým hydrofilním, polárním substituentem, který slouží jako takový klobouček „cap“. Výrobci uvádí v parametrech kolony i údaj o případném endcappingu, avšak obvykle nezveřejňují přesné informace o struktuře daných sorbentů, takže konkrétní látky použité pro endcapping nebývají specifikovány [34].

Stacionární fáze na bázi kovových oxidů se vyznačují lepší chemickou stabilitou ve srovnání se silikagem, což zahrnuje možnost pracovat v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách (do cca 200 °C), díky čemuž může být vývoj metody flexibilnější. Nejčastěji se používá oxid zirkoničitý, dále je možné využít také oxid hlinitý či oxid titaničitý [34].

Dalším typem SF jsou polymerní fáze, které se obvykle vyznačují stabilitou v celém rozsahu pH i při vysokých teplotách. K separaci analytů na reverzních fázích se nejčastěji používá kopolymer styrenu a divinylbenzenu, v menší míře i polyvinylalkohol a metakryláty. V případě reverzních fází jsou kompatibilní s běžně používanými organickými rozpouštědly, avšak v případě vysokého obsahu organické složky v MF, může dojít ke srážení či bobtnání těchto fází [34].

Kombinací anorganického silikagelu s organickým organosilanem vznikly tzv. hybridní stacionární fáze. Tato kombinace spojuje nejlepší vlastnosti silikagelu (účinnost, mechanickou stabilitu) s nejlepšími vlastnostmi polymeru (pH, teplotní stabilita a absence volných silanolových skupin) [34].

2.3 Hmotnostní spektrometrie

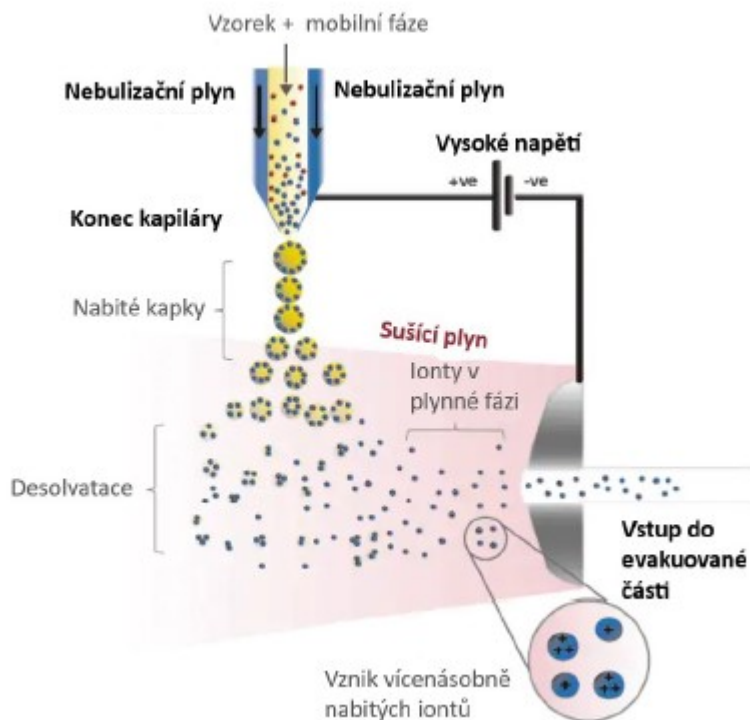
Hmotnostní spektrometrie je separační analytická metoda, jejíž základní princip spočívá v převedení molekul na ionty, v separaci těchto iontů dle jejich poměru hmotnosti a náboje „ m/z “ a následný záznam relativních intenzit jednotlivých iontů [39, 40]. Je to vysoce citlivá metoda, která poskytuje kvalitativní i kvantitativní informace o analyzované látce. Vzhledem k tomu, že se jedná o destruktivní metodu, je

v analytickém systému řazena vždy na konec [40]. Mezi základní části hmotnostního spektrometru patří iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor.

2.3.1 Ionizační techniky

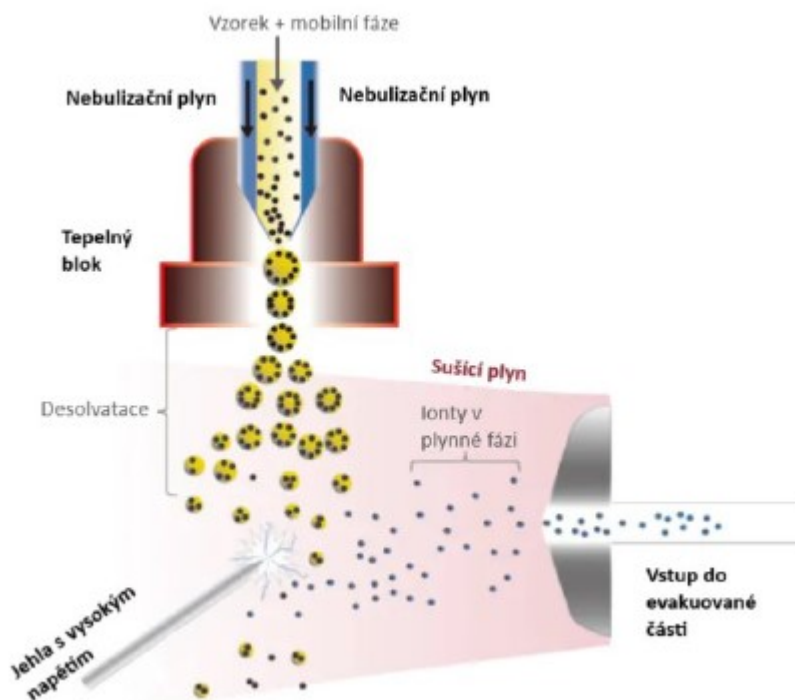
Jak je uvedeno výše, iontový zdroj patří k základním částem hmotnostního spektrometru. U LC-MS slouží tento zdroj jako rozhraní neboli interface, který spojuje kapalinový chromatograf se spektrometrem [35, 40]. Odehrává se zde děj zvaný ionizace, což je přeměna neutrálních molekul analytu na nabitě částice (ionty) [40]. Ve spojení LC-MS se běžně používají tzv. měkké ionizační techniky, které pracují za atmosférického tlaku (tzv. API techniky). Jedná se o šetrnější techniky ve srovnání s elektronovou ionizací, jelikož ionizovaná molekula získává mnohem menší množství energie, a proto nejčastěji vznikají (de)protonované ionty analytu [34]. Tyto techniky zahrnují ionizaci elektrosprejem (ESI), chemickou ionizaci za atmosférického tlaku (APCI) a dále fotoionizaci za atmosférického tlaku (APPI) [34]. První dvě zmíněné ionizační techniky jsou standardem pro komerční LC-MS systémy, APPI technika je spíše alternativa vhodná pro nepolární a velmi termolabilní látky [40]. Na základě nastavených parametrů jednotlivých ionizačních zdrojů probíhá ionizace buď v pozitivním nebo negativním módu. Záznam kladných iontů je vhodný pro širokou skupinu látek a je takřka univerzální, zatímco záznam záporných iontů je vhodný pro sloučeniny, které ve své struktuře obsahují sulfo-, karboxy-, (poly)hydroxy- nebo nitro- skupiny, halogenované sloučeniny, organokovy atd. [40]. Nevýhodou těchto technik může být skutečnost, že naměřená spektra nelze porovnávat s rozsáhlými knihovny jako v případě elektronové ionizace [30, 34].

Ionizace elektrosprejem je nejčastěji používaná ionizační technika ve spojení LC-MS (Obrázek 4). Tato metoda je vhodná pro analýzu středně polárních až velmi polárních látek včetně biomakromolekul (např. peptidy) [41, 40]. Kovová kapilára, na kterou je vloženo vysoké napětí (3 až 5 kV) přivádí eluent (obsahující mobilní fázi a rozpuštěné analyty) do iontového zdroje. Za pomoci zmlžujícího plynu je eluent na výstupu z kapiláry rozprašen, přičemž vznikající kapky nesou velké množství nábojů. Postupným odpařováním mobilní fáze dochází ke zvyšování hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty (Rayleighův limit) způsobí odpudivé síly tzv. Coulombickou explozi, která způsobí rozpad kapek a tvorbu samostatných iontů nesoucích jeden či více nábojů [29, 35, 40, 42]. Typické průtoky mobilní fáze pro tuto techniku jsou od 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ do 1 ml/min [34].



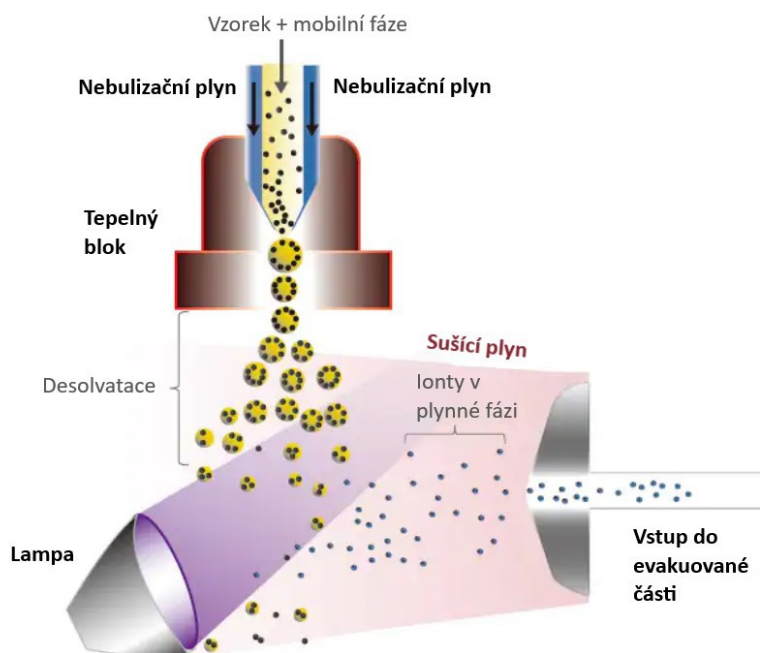
Obrázek 4: Schematické znázornění ionizace elektrosprejem. Převzato z: [43].

Další často používanou metodou, jež je vhodná pro málo polární až nepolární látky o nízké molekulové hmotnosti (cca do 1000 až 1500 Da) je ionizace za atmosférického tlaku (Obrázek 5) [41]. Výhodou oproti ESI je možnost použít vyšších průtoků mobilní fáze (až 2 ml/min), zatímco nevhodná je pro látky termolabilní, jelikož se pracuje za vysoké teploty (kolem 400 °C). Eluát je přiváděn kapilárou, která je umístěna ve vyhřívané zóně, na jejímž konci je tento eluát, za pomoci vysoké teploty a zmlžujícího plynu, rychle odpařen. V iontovém zdroji je dále umístěna výbojová jehla, na kterou je vloženo vysoké napětí (cca 10 kV), čímž vznikne koronární výboj, díky kterému jsou ionizovány molekuly mobilní fáze (především molekuly vody a dusíku). Ty pak předávají náboj analytu. Vzniklé ionty jsou elektrodami usměrňovány do analyzátoru. Na rozdíl od ionizace elektrosprejem zde častěji dochází k fragmentacím [19, 30, 41].



Obrázek 5: Schematické znázornění chemické ionizace za atmosférického tlaku. Převzato z: [43].

Modifikaci výše uvedené techniky představuje fotoionizace za atmosférického tlaku (Obrázek 6). Její použití je však mnohem menší. Své využití nachází zejména při ionizaci méně polárních látek, které nejsou vhodné pro metodu ESI či APCI [35, 41, 43]. Má obdobné uspořádání jako metoda APCI, s rozdílem, že zde je pro tvorbu iontů používáno UV záření a vlastní ionizace je způsobena fotony [35, 41]. Ionizované molekuly musí mít nižší ionizační energii než fotony, aby došlo k fotoexcitaci a následné ionizaci. Vzhledem k tomu, že přímá ionizace analytu je méně pravděpodobná, používá se tzv. dopant (aceton, toluen), který předává získaný náboj analytu [35, 43].



Obrázek 6: Schematické znázornění fotoionizace za atmosférického tlaku. Převzato z: [43].

2.3.2 Analyzátoary

Tak jako je kolona srdcem chromatografického systému, tak analyzátoar je možno nazvat srdcem hmotnostního spektrometru [34]. Poté, co ionty opouští iontový zdroj, vstupují do analyzátoaru, který ve vysokém vakuu rozděluje ionty dle jejich poměru m/z na základě různých fyzikálních principů, které budou pro vybrané analyzátoary popsány níže.

Hmotnostní analyzátoary se liší v jednotlivých parametrech, kterými jsou rozlišení, správnost, hmotnostní rozsah, lineární dynamický rozsah a dále také účinnost a citlivost [19, 30, 34, 35]. Rozlišení vyjadřuje schopnost analyzátoaru detekovat ionty s velmi blízkou hodnotou m/z . Dle této rozlišovací schopnosti dělíme analyzátoary na ty s nízkou rozlišovací schopností (<10 000), mezi které řadíme iontovou past a kvadrupól a na ty s vysokou rozlišovací schopností nazývané též HRMS (>10 000). HRMS analyzátoary jsou schopny měřit hodnoty m/z se správností <5 ppm, při níž je možné určit elementární složení daného iontu. Do této skupiny řadíme analyzátoar doby letu (TOF), orbitrap a iontovou cyklotronovou rezonanci s Fourierovou transformací (FT-ICR) [44]. Dalším významným parametrem je správnost, jež popisuje míru schopnosti analyzátoaru určit správnou hodnotu m/z . Je to vlastně rozdíl mezi naměřenou a teoretickou hodnotou m/z [34, 35, 40, 42, 44].

Magnetický sektorový analyzátor

Historicky to byl první široce používaný analyzátor, nyní je však jeho využití spíše omezené a z velké části je již nahrazený kvadrupólem a iontovou pastí. Princip spočívá ve využití zakřivení dráhy letu iontu, ke kterému dochází při průchodu magnetickým polem (poloměr dráhy iontů je úměrný poměru m/z). Ionty jsou nejprve urychleny vysokým napětím do magnetického pole (vytvořeného elektromagnetem ve tvaru kruhové výseče) a dále analyzovány. Hmotnostní spektrum je získáno plynulou změnou (tzv. skenováním) magnetického pole nebo urychlovacího napětí, díky čemuž projdou na detektor postupně všechny ionty [29]. Magnetický sektorový analyzátor s dvojitou fokusací má kromě magnetické fokusace i elektrostatickou, čímž se významně zvýší jeho rozlišení [30].

Kvadrupólový analyzátor (Q)

Mezi výhody tohoto analyzátoru řadíme jeho jednoduchost a cenovou dostupnost. Naopak nevýhodou může být menší rozsah měřených hmotností a nižší rozlišovací schopnost. Princip separace iontů spočívá ve stabilitě jejich trajektorie v oscilujícím elektrickém poli. Uvnitř analyzátoru jsou umístěny čtyři kovové tyče, na které je vloženo stejnosměrné a vysokofrekvenční střídavé napětí. Ion, který je přiveden do středu osy, začne oscilovat. Nastavení hodnot napětí předurčuje, který ion s určitým poměrem m/z projde k detektoru, všechny zbývající jsou zachyceny na tyčích kvadrupólu [19, 38]. Hmotnostní spektrum je tvořeno plynulou změnou hodnot stejnosměrného a střídavého napětí [19]. Kvadrupólový analyzátor je často kombinován s dalšími analyzátory (další kvadrupóly, analyzátor doby letu, orbitrap atd.), kde má funkci iontového filtru [42].

Iontová past (IT)

Tento analyzátor je založen na podobném principu jako kvadrupól, přičemž existuje dvojrozměrná (lineární-LIT) a trojrozměrná (3D-IT) konfigurace. Konvenční 3D konfigurace je tvořena kruhovou elektrodou a dvěma koncovými elektrodami, na které je vloženo napětí. Ionty jsou přiváděny do pasti vstupním otvorem koncové elektrody. Vhodnými poměry napětí jsou jednotlivé ionty zadržovány v pasti. Tyto poměry jsou postupně měněny, a tím jsou ionty dle poměru m/z vypuzovány na detektor. Stejným způsobem může být určitý ion vybrán a podroben fragmentaci před vypuzením na detektor [19, 30, 35, 43]. Svou rozlišovací schopností a správností určení m/z je tato technika srovnatelná s kvadrupólem. Iontové pasti jsou však často využívány v tandemové spektrometrii (MS_n), protože umožňují uchovávání iontů v analyzátoru

a následně provádění MS_n experimentů, čehož se často využívá u kvantitativní analýzy [42, 43].

Analyzátor doby letu (TOF)

Tento hmotnostní analyzátor zaznamenává dobu letu iontů ve vakuové letové trubici, do které jsou urychleny napěťovým pulzem. Ionty s různou hodnotou m/z se při stejné energii pohybují různou rychlostí, a tedy v různém čase dopadají na detektor (ionty s menšími hodnotami m/z se pohybují rychleji) [29, 30]. Tento analyzátor se vyznačuje širokým rozmezím hodnot m/z , které je schopen detekovat v závislosti na době trvání analýzy a délce letové trubice. Má však nižší rozlišovací schopnost, kterou lze vylepšit použitím tzv. reflektoru (iontového zrcadla), který otáčí směr letu, díky čemuž se prodlouží dráha i doba letu a rovněž jsou tím sjednoceny kinetické energie iontů se stejnou m/z , čímž pádem dopadnou na detektor ve stejnou chvíli [29, 30, 42, 43].

2.3.3 Detekce

U většiny hmotnostních analyzátorů přechází ionty do detektoru. Princip detekce je založen na dopadu iontů na povrch detektoru a na tvorbě sekundárních elektronů, které jsou dále zesilovány, díky čemuž vzniká měřitelný proud [41, 39]. Mezi konvenční detektory řadíme elektronový násobič, fotonásobič a Faradayovu klec, novějšími typy detektorů jsou např. mikrokanálková destička nebo channeltron [39]. Orbitální past a iontová cyklotronová rezonance nepotřebují detektor, jelikož frekvenci převádí na hmotnostní spektrum Fourierova transformace (odehrává se přímo v analyzátoru) [41].

2.3.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

V současnosti je velmi rozšířené kombinování hmotnostních analyzátorů, což přináší celkové zlepšení analytických i identifikačních schopností. V MS/MS uspořádání dochází nejprve k fragmentaci sledovaných (prekurzorových) iontů a následně jsou tyto fragmentované (produktové) ionty podrobeny hmotnostní analýze. Spojení těchto kroků může být provedeno buď v čase, kdy jsou všechny kroky provedeny v jednom analyzátoru ale v jiné časové sekvenci (iontová past) nebo v prostoru, kde jsou jednotlivé kroky provedeny ve vícero analyzátozech (např. trojitý kvadrupól– QqQ). V trojitém kvadrupólu slouží prostřední analyzátor jako tzv. kolizní cela, ve které jsou ionty fragmentovány pomocí kolizního plynu [19, 34, 42, 44]. Mezi největší výhody kvadrupólových analyzátorů řadíme rychlost měření a také možnost provádět fragmentace s následnou detekcí produktových iontů (SRM), čehož se hojně využívá

v kvantitativní analýze [42]. V případě, kdy jsou spojeny různé typy analyzátorů, hovoříme o tzv. hybridních spektrometrech. Mezi oblíbené hybridní analyzátory patří spojení kvadrupólu s analyzátozem doby letu (QqTOF), kvadrupólu s orbitrapem nebo lineární iontové pasti s ICR či orbitrapem [19, 34, 44].

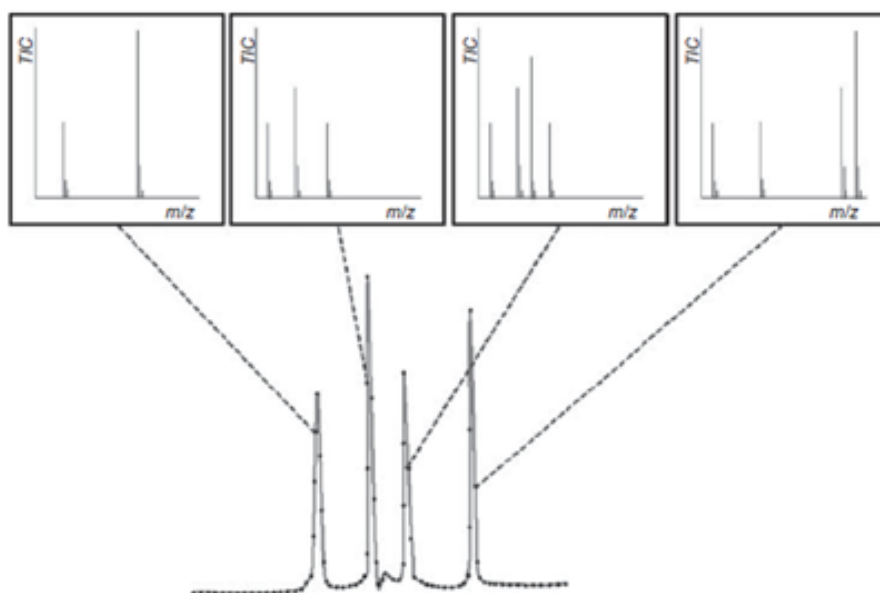
2.4 Spojení LC-MS

Kombinace dvou separačních technik, a to kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, se stala klíčovým analytickým nástrojem v bioanalýze [38, 36]. Využívá se nejen k identifikaci látek v biologických matricích, ale také k jejich kvantifikaci, a to i velmi nízkých koncentrací. Mezi hlavní výhody spojení LC-MS patří vysoká spolehlivost, citlivost, selektivita, rychlost analýzy, možnost automatizace, menší spotřeba vzorku, široký lineární rozsah, účinnější separace, nižší spotřeba MF a možnost analyzovat i velmi komplexní vzorky [30, 34, 35].

Vzhledem k tomu, že se mobilní fáze v hmotnostním spektrometru přímo účastní procesu ionizace, je nutné použít pouze těkavé MF jako je acetonitril (ACN) nebo methanol (MeOH) a v případě vodných pufrů je doporučováno použití těkavých aditiv ve velmi nízkých koncentracích (kyselina mravenčí, octová, mravenčan či octan amonný). Všechna použitá rozpouštědla by měla být ve vhodném stupni čistoty označované jako „LC-MS grade“ [34, 45, 35].

2.5 Interpretace a kvantifikace výsledků

Všechny moderní hmotnostní spektrometry jsou napojeny na počítač se sofistikovaným softwarem pro analýzu dat. Datový výstup ze spektrometru se nazývá hmotnostní spektrum. Je to graf závislosti intenzity iontů na jejich m/z [29]. LC-MS analýza poskytuje dva hlavní výstupy, a to chromatogram, kde jsou analyty zaznamenány jako chromatografické píky a hmotnostní spektra. Každý bod chromatogramu představuje intenzitu signálu hmotnostního spektra zaznamenaného v konkrétním časovém bodě (Obrázek 7) [30].



Obrázek 7: Ukázka chromatogramu a hmotnostního spektra. Převzato z: [30].

Skenováním všech m/z hodnot můžeme systémem MS získat záznam celého spektra (tzv. full scan záznam) či sledováním jedné specifické m/z hodnoty získáme tzv. SIM (selected ion monitoring) záznam. V případě tandemové spektrometrie můžeme získat sken produktových či prekurzorových iontů, selektivní záznam jedné nebo více reakcí (SRM nebo MRM sken) a sken neutrálních ztrát [34].

Pro kvantifikaci v LC-MS je nezbytné použít vnitřní standard (IS). Použití vnitřního standardu zlepšuje přesnost a preciznost kvantifikace stejně jako robustnost analytické metody. Rovněž slouží jako korekční faktor u matricových efektů [35, 46]. Výběr vnitřního standardu musí být pečlivý s ohledem na strukturální a fyzikálně-chemickou podobnost s analytem. Zároveň musí mít odlišnou molekulovou hmotnost a nesmí se vyskytovat v analyzovaném vzorku.

V případě LC-MS analýzy lze kromě strukturních analogů použít izotopicky značené IS (SIL, z anglického „stable isotopically labelled“). SIL standardy jsou nejvhodnější a měly by být použity vždy, kdy je to možné. Jejich molekulární hmotnost by měla v ideálním případě být o 4 až 5 daltonů vyšší než hmotnost analytu, aby se redukovaly izotopické interference. Standardy značené ^{13}C a/nebo ^{15}N jsou sice vhodnější skrze větší shodu s analytem, ale v praxi bývají častěji používané ty značené deuteriem a to z důvodu nižší ceny [30, 46].

V případě, kdy nejsou SIL standardy dostupné či je jejich cena příliš vysoká, lze použít strukturní analogy. Nejvhodnější analogy jsou ty, jež mají klíčové chemické struktury a skupiny stejné jako analyt a rozdíl je pouze v délce C-H skupin [46].

Pro zajištění dostatečné přesnosti, správnosti a spolehlivosti musí být před kvantifikací látek v komplexních vzorcích provedena validace dané metody. Mezi základní validační parametry patří: linearita, stanovení limitu kvantifikace, přesnost, preciznost, výtěžnost, přenos, stabilita a v případě MS detekce je nutné hodnotit i matricové efekty (ME) [45, 47, 48].

Fenomén obecně známý jako matricové efekty představuje jednu z největších komplikací v kvantitativních LC-MS analýzách komplexních biologických vzorků. Příčinou vzniku matricových efektů jsou látky obsažené v matrici, které mohou být během úpravy vzorku extrahovány spolu s analyty, a tím pádem mohou rovněž vstupovat do iontového zdroje, kde soutěží s analytem o získání náboje a mohou tak signál analyzované látky potlačit či zesílit [45, 35]. Vzhledem k tomu že ME mohou významně ovlivnit výsledky kvantitativní analýzy, musí být tento parametr hodnocen [32]. Ověření vlivu matricových efektů může být provedeno několika přístupy, kdy nejčastěji se používá metoda post extrakčního nebo post kolonového přídatku [45].

2.6 Úprava vzorků

Biologické vzorky jsou komplexní matrice, které mnohdy obsahují různé interferující látky (např. proteiny, soli, lipidy, sacharidy atd.), které mohou negativně ovlivňovat analýzu, a proto je potřeba tyto vzorky před vlastní analýzou vhodně upravit a ideálně tyto nežádoucí látky odstranit. Tyto látky mohou způsobit matricové efekty (nejčastěji způsobené fosfolipidy či zbytky solí z matrice) či kontaminaci instrumentu [49, 50]. Navíc jsou analyty v biologických komplexních matricích často přítomny v nízkých koncentracích, a tudíž je mnohdy potřeba jejich zakoncentrování [51]. Úprava vzorku představuje až 60 nebo dokonce 80 % z celkového času analýzy, a to z důvodu intenzivních, více krokových a časově náročných postupů [50]. Vzhledem k tomu, že úprava vzorku představuje kritickou a časově nejnáročnější část, jež má vliv na všechny následující kroky v celém analytickém procesu, je obzvláště důležitý správný výběr metody úpravy vzorku [45].

K tradičním a v praxi velmi často používaným metodám řadíme proteinovou precipitaci, extrakci z kapaliny do kapaliny a extrakci na tuhou fázi. Tyto techniky jsou v analytických laboratořích velmi rozšířené, obvykle dobře optimalizované a reprodukovatelné [50]. U všech těchto metod je pro zvýšení propustnosti vzorků v laboratořích možnost využití 96-jamkového formátu, díky kterému je možná částečná automatizace celého procesu [41].

Precipitace proteinů je rychlá, jednoduchá a levná metoda, která je nejčastěji používaná pro přečištění matric bohatých na proteiny, jako je plná krev, plazma či sérum [52, 53]. Její princip spočívá v odstranění proteinů za pomoci precipitačního činidla, kterým jsou nejčastěji organická rozpouštědla (acetonitril, methanol), ale mohou být použity i silné kyseliny (trichloroctová, chloristá) či soli vícemocných iontů (např. síran zinečnatý, měďnatý) [45]. Nevýhodou této metody je naředění a nízké přečištění vzorku, jelikož jsou takto odstraněny pouze proteiny. Ve vzorku tedy nadále zůstávají ostatní interference a je zde velké riziko vzniku matricových efektů [45, 52, 53]. I přes to je PP jednou z nejčastěji využívaných metod. Tato technika nevyžaduje žádné speciální přístrojové vybavení, a navíc je nenáročná na optimalizaci.

Extrakce na tuhou fázi patří díky své vysoké výtěžnosti a účinnému zakoncentrování vzorku mezi oblíbené techniky pro analýzy biologických tekutin. Díky široké škále komerčně dostupných sorbentů je tato metoda vhodná pro analyty s různými chemickými strukturami i polaritami [45, 52, 54]. Analyt je extrahován na základě interakcí (např. polární, nepolární, iontové či afinitní) mezi pevnou stacionární (extrakční kolonka) a kapalnou fází. Jednotlivé druhy sorbentů jsou obdobné těm používaným v HPLC. Tato metoda je časově náročnější v porovnání s PP, je zde také větší počet operačních kroků, dále je relativně finančně náročná (kolonky jsou často určeny pro jednorázové použití) a má stále velkou spotřebu organických rozpouštědel [52].

Extrakce z kapaliny do kapaliny patří také mezi první techniky vyvinuté pro úpravu vzorků a vyznačuje se jednoduchým principem. Extrakce je založena na rozdělení analytu mezi extrakčním organickým činidlem nemísitelným s vodou a vodným vzorkem na základě rozdělovacího koeficientu oktanol/voda ($\log P$). Pro účinnou extrakci do organické fáze je nutné vhodně optimalizovat pH vzorku, aby byly molekuly analytu ve své neionizované formě [45, 55]. Při správně zvolených podmínkách je touto metodou možné odstranit ze vzorku soli i fosfolipidy, a tudíž potlačit či úplně odstranit vliv matricových efektů. Co se týče optimalizace procesu, provedení či přístrojového vybavení není metoda nijak náročná, má však řadu nevýhod. Vysoká spotřeba organických rozpouštědel, časová náročnost, možná tvorba emulzí, obtížnější extrakce polárních látek a také nutná rekonstituce vzorku při LC-MS analýze na reverzních fázích patří mezi hlavní z nich [50, 55, 52].

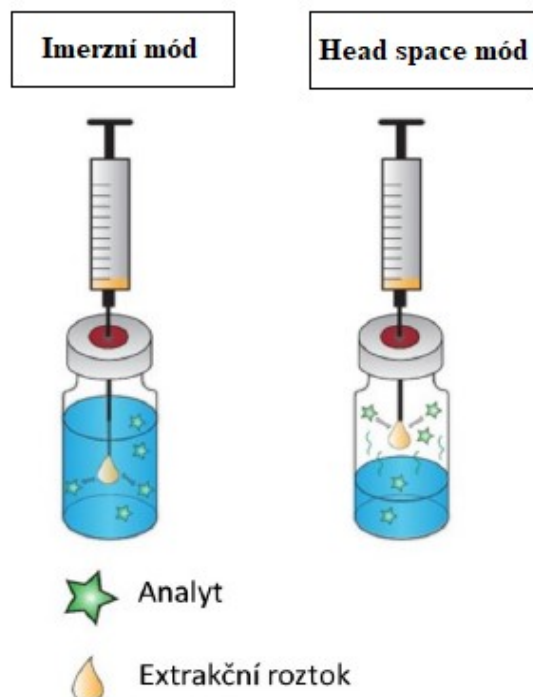
Moderní trendy v úpravě vzorků se zaměřují především na redukci organických rozpouštědel i množství potřebného vzorku, automatizaci, zvýšení selektivity, snížení finančních nákladů a zdrojů potencionálních chyb a dále na snížení jednotlivých kroků

a tím zkrácení celkového času. Významným směrem v úpravě vzorků je jejich miniaturizace (tzv. mikroextrakce) [45, 51, 50]. Mikroextrakční metody můžeme dle jejich principu rozdělit do 2 hlavních kategorií, a to na metody odvozené od LLE a od SPE. Mezi mikroextrakční metody založené na principu SPE řadíme např. mikroextrakci na tuhou fázi, sorpční extrakci za pomoci magnetického míchadla (SBSE), extrakci pomocí jednorázových pipetovacích špiček (DPX) nebo mikroextrakci pomocí plněného tuhého sorbentu (MEPS). Mikroextrakce založené na principu LLE zahrnují extrakci do jediné kapky rozpouštědla (SDME), mikroextrakci pomocí dutého vlákna, disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapaliny a extrakci z kapaliny do kapaliny podpořené tuhou fází (SLE) [45]. Vybrané mikroextrakční metody odvozené od LLE budou podrobně diskutovány v následující kapitole.

2.7 Mikroextrakce odvozené od LLE

2.7.1 Extrakce do jediné kapky rozpouštědla

Tato technika využívá k extrakci mikrokapku organického rozpouštědla, která visí na špičce jehly standardní Hamiltonovy mikrostříkačky. Kapka může být umístěna buď přímo ve vodném roztoku vzorku, tzv. imerzní mód či nad ním tzv. headspace (HS) mód, viz Obrázek 8. Vlastní extrakce analytu probíhá na základě pasivní difuze neionizovaných analytů. Po extrakci je kapka nasáta zpět do mikrostříkačky, a dále nastříknuta do systému plynové (GC) či po rekonstituci do kapalinové chromatografie nebo kapilární elektroforezy (CE). Není vyžadováno žádné speciální zařízení a její provedení je velmi jednoduché. Nicméně značná nestabilita kapky, její nežádoucí disoluce ve vzorku a také její malý povrch vedoucí k delším extrakčním časům patří mezi největší nevýhody [30, 4]. Z těchto důvodů je její využití v bioanalýze relativně malé [6].

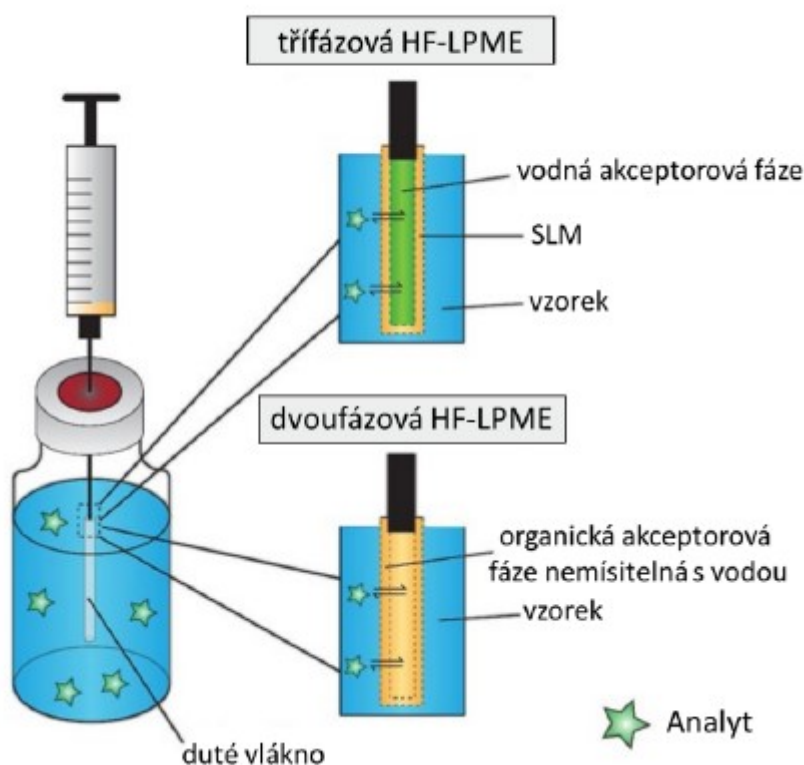


Obrázek 8: SDME extrakce v dvojitým uspořádání. Převzato z: [44].

2.7.2 Mikroextrakce do kapalné fáze pomocí dutého vlákna

V roce 1999 Pedersen-Bjergaard a Rasmussen představili metodu mikroextrakce do kapalné fáze pomocí dutého vlákna [56]. Organické rozpouštědlo je imobilizováno v pórech stěny polypropylenového dutého vlákna (několika sekundovým ponořením vlákna do rozpouštědla), kde funguje jako tzv. kapalná membrána (supported liquid membrane, tzv. SLM). Vnitřek dutého vlákna je naplněn několika mikrolitry akceptorové fáze a vlákno je následně umístěno do roztoku vzorku (imerzní mód) či nad něj (HS-HF-LPME). Hnací silou pro přechod analytů z roztoku vzorku do akceptorové fáze je, stejně jako u metody SDME, pH gradient a s ním související pasivní difuze molekul analytu. Díky nízkému objemu akceptoru je vzorek účinně zakoncentrován. Spotřeba organického rozpouštědla je pouze 5-30 μl , díky čemuž tato metoda splňuje požadavky tzv. zelené chemie [4, 57, 58]. Oproti technice SDME je zde několik výhod, jako možnost míchání vzorku při vyšších otáčkách, snazší přenos hmoty z důvodu větší plochy kontaktu a vysoká míra přečištění vzorku, jelikož duté vlákno slouží jak chemická, tak i fyzikální bariéra. U této metody jsou využívány dva způsoby provedení – dvoufázové a třífázové (Obrázek 9), přičemž každé z nich je kompatibilní s jinou následnou analytickou metodou. U dvojfázového uspořádání je stejné organické rozpouštědlo umístěno uvnitř vlákna (akceptor) i v jeho pórech (SLM). Toto je vhodné zejména pro hydrofobní analyty a finální extrakt lze přímo nastříknout do GC instrumentu. Naopak

trojfázové uspořádání, kde akceptorem je vodný roztok, je přímo kompatibilní s metodami LC či CE. Jak je uvedeno výše, pouze neionizovaná forma analytů může prostupovat kapalnou bariérou, což lze zajistit správným nastavením pH. V případě polárních analytů, které jsou omezeně extrahovány prostou difuzí, je možné využít tzv. přenašeče, jež vytvářejí hydrofobní iontové páry s analyty, které snáze prostupují přes membránu [59].



Obrázek 9: HF-LPME extrakce ve dvoufázovém a třífázovém provedení. Převzato z: [44].

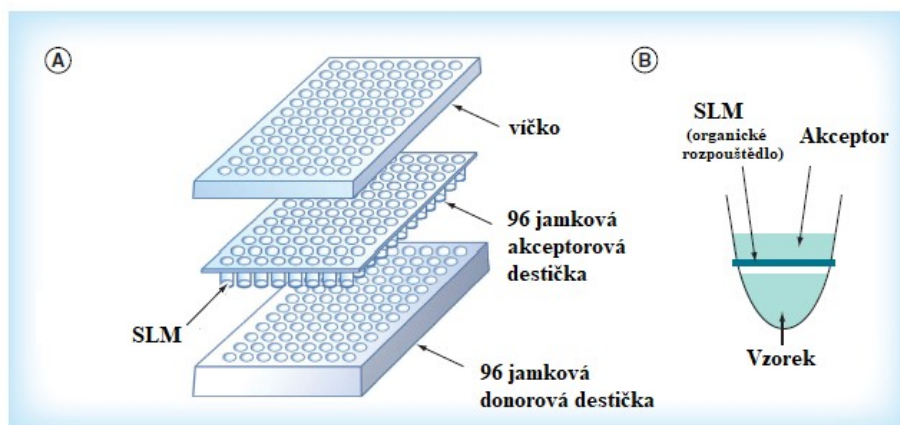
Parametry ovlivňující extrakci (typ organického rozpouštědla použitého na SLM, složení a pH donorového či akceptorového roztoku, délka extrakčního času či rychlost míchání) musí být vhodně optimalizovány. Výběr organického rozpouštědla pro SLM je klíčovým parametrem této techniky. Rozpouštědlo musí být nemísitelné s vodou, schopné se pevně imobilizovat v pórech vlákna, mělo by být málo těkavé, mít nízkou viskozitu a v případě dvojfázového uspořádání musí být kompatibilní se selektivní analytickou metodou. Toluén, 1-oktanol, dodecylacetát (DDA) a dihexylether (DHE) splňují tyto požadavky a bývají hojně využívány v obou módech HF-LPME. Typ dutého vlákna a jeho rozměry jsou rovněž důležitou součástí optimalizace metody. Polypropylen je obvykle volen díky svým hydrofobním vlastnostem a kompatibilitou se širokou škálou

organických rozpouštědel. Rozměry dutého vlákna musí zajistit dostatečnou kontaktní plochu, odpovídající objemový poměr donoru a akceptoru, mechanickou stabilitu a velikost pórů musí umožnit snadnou penetraci cílených analytů [59].

Tato technika je využívána v enviromentální, potravinové či bioanalytické oblasti, avšak kromě nevýhody spočívající v délce extrakčního času je zde problém i s komerční dostupností vybavení pro tuto metodu a nízkou možností automatizace, což komplikuje její využití v klinické praxi. V roce 2013 byla představena tato metoda v 96-jamkovém formátu, tzv. „parallel artificial liquid membrane extraction“ (PALME), jejíž veškeré vybavení je komerčně dostupné a zároveň tento formát zvyšuje propustnost vzorků laboratoří [6].

2.7.3 PALME

Tato extrakce je založena na stejném principu jako HF-LPME s tou změnou, že probíhá přes plochou membránu v tzv. sandwichovém formátu. Tento extrakční systém se skládá ze dvou odlišných 96-jamkových destiček: spodní donorové a vrchní akceptorové [7, 60]. U akceptorové destičky je na spodní straně každé jamky umístěn tenký porózní filtr z polyvinylidenfluoridu (PVDF, 0,45 μm), na který je ukotveno organické rozpouštědlo, jež tvoří SLM. Poté je roztok vzorku napipetován do příslušných jamek donorové destičky, na kterou je následně umístěna destička akceptorová, do jejíž jamek je nakonec napipetován akceptorový roztok (Obrázek 10). Akceptorová destička je pro prevenci odpařování akceptoru během extrakce překryta hliníkovou fólií a po důkladném uzavření je celá tato sestava umístěna na třepačku [7, 60]. Jistou nevýhodou může být limitace objemu vzorku, jež je dána objemem jednotlivých jameček. Vzorku může být maximálně 250 μl a minimálně cca 200 μl , aby docházelo ke kontaktu se SLM, zatímco objem akceptoru bývá obvykle v rozmezí 50-100 μl [44, 61].



Obrázek 10: PALME uspořádání. (A) spodní část je donorová destička (vzorek), prostřední část je akceptorová destička (kapalná membrána a akceptorový roztok) a vrchní část je ochranné víčko. (B) schématické znázornění jedné jamky. Převzato z: [60] a upraveno.

Opět zde platí, že pH vzorku musí být nastaveno tak, aby byl cílový analyt neionizovaný, zatímco pH akceptorového roztoku je potřeba nastavit tak, aby byl analyt ionizován pro zabránění zpětné extrakce analytu do SLM. V případě extrakce bazických analytů bude mít vzorek bazické pH, zatímco akceptor bude kyselý [7]. Pro bazické analyty se nejčastěji používá jako organické rozpouštědlo dodecylacetát, dihexylether, isopentylbenzen a n-hexadekan. Pro extrakci kyselých látek jsou nejčastěji voleny alifatické alkoholy, jako 1-oktanol a 1-nonanol [44]. Stejně jako u předchozí uvedené metody jsou i zde problémy související s nízkou výtěžností u polárních látek. Toto lze rovněž vyřešit přidáním vhodného přenašeče, a to buď do donorového roztoku, anebo do organického rozpouštědla tvořícího SLM. Vhodným SLM přenašečem je například di(ethylhexyl)fosfát (DEHP). Optimalizují se stejné parametry jako v případě HF-LPME (výběr vhodného organického rozpouštědla, pH donorové a akceptorové fáze, rychlost třepání a délka extrakce [44, 60, 53].

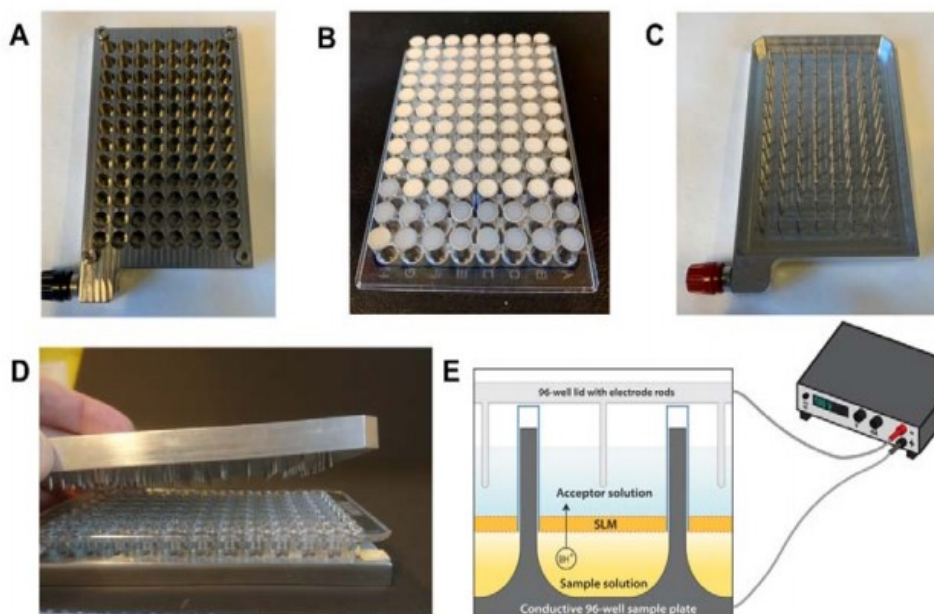
PALME se vyznačuje jednoduchým pracovním postupem (nízký počet operačních kroků), nízkou spotřebou organických rozpouštědel (3-5 μm) a také vysokou měrou přečištění vzorku. Kromě nabitých sloučenin, které neprojdou skrz SLM jsou velmi účinně odstraněny i větší molekuly jako proteiny, ale také fosfolipidy. Nicméně stále zde zůstává nevýhoda v delším extrakčním čase, který bývá obvykle v rozmezí 30-60 minut [7, 6, 53, 61, 44]. Zvýšení efektivity extrakce a zkrácení extrakčních časů bylo dosaženo modifikací HF-LPME, tedy její kombinací s elektrickým polem, kdy vznikla tzv. elektromembránová extrakce [62].

2.7.4 Elektromembránová extrakce

Tato technika byla poprvé představena v roce 2006 Pedersen-Bjergaardem a Rasmussenem jako inovace třífázové HF-LPME [62]. Základní princip extrakce je však zcela odlišný. Na rozdíl od výše zmíněných mikroextrakčních technik je zde princip založen na elektrokinetické migraci nabitých (ionizovaných) molekul analytu v elektrickém poli. Vložením napětí pomocí dvou elektrod do EME systému dochází k transferu ionizovaných sloučenin z vodného roztoku vzorku přes SLM do akceptorového roztoku. Dle směru elektrického pole můžeme extrahovat buď kyselá nebo bazická sloučeniny. Pro bazická sloučeniny, jež jsou extrahovány jako kationty je záporně nabitá katoda umístěna do akceptorového roztoku a anoda do roztoku donorového. Pro kyselá analyty, jež jsou extrahovány jako anionty je uspořádání elektrod opačné [63, 64].

Pro účinnou extrakci je potřeba hodnotu pH nastavit tak, aby byla zajištěna plná ionizace cílených analytů, a to jak v akceptorovém, tak donorovém roztoku. Klíčovým parametrem je zde rovněž volba organického rozpouštědla, která ovlivňuje účinnost transferu analytů i selektivitu metody. Ideální rozpouštědlo by mělo splňovat několik kritérií, jako jsou dobré hydrofobní vlastnosti pro účinnou vazbu na porózní filtr, schopnost hydrogenových nebo dipól-dipól interakcí s analytem k usnadnění přestupu vzorku a nízkou viskozitu k udržení rychlého přenosu analytů. Dále nesmí být mísitelné s vodou a musí mít vysoký bod varu. Pro bazická analyty je nejvíce používán 2-nitrofenyloxyethylether (NPOE), pro polárnější látky se v menší míře používá i 2-nitrophenylpentylether (NPPE). Pro látky kyselá jsou vhodné některé alkoholy jako např. 1-oktanol [64-67]. Pro podporu extrakce polárních látek je možné použít vhodnější SLM, např. bis(2-ethylhexyl)fosfit (DEHPi) nebo i zde lze použít příměsi do SLM, např. DEHP, tris-(2ethylhexyl)fosfát (TEHP) a tributylfosfát (TBP) [44].

EME byla původně vyvinuta v konfiguraci HF-LPME, ale postupem času byla tato metoda modifikována i do 96-jamkového formátu, viz Obrázek 11 [64, 65, 68].



Obrázek 11: EME uspořádání. (A) Spodní část je donorová destička obsahující donorový roztok. (B) 96-jamková filtrační destička obsahující akceptorový roztok. (C) Hliníkové víko s 96 elektrodami. (D) Všechny části přiklopeny k sobě. (E) Ilustrace extrakční sestavy spojené s vnějším energetickým zdrojem. Převzato z: [68] a upraveno.

Oproti HF-LPME či PALME se EME vyznačuje rychlými extrakčními časy, které se pohybují typicky v rozmezí 5 až 15 min [63, 64]. Stejně jako u PALME je potřeba optimalizovat výběr SLM, složení donorové a akceptorové fáze, rychlost třepání a délku extrakce. Navíc je důležité vhodně optimalizovat velikost vloženého napětí, aby generovalo maximálně 50 až 100 μA na jamku, protože jinak by díky vzniklé elektrolýze hrozila formace bublin a změna pH v roztocích. Stejně jako u HF-LPME i zde není komerční dostupnost vybavení pro tuto metodu, což patří mezi její hlavní nevýhodu [59].

3 Cíle práce

Tato rigorózní práce je věnována optimalizaci dvou mikroextrakčních technik v 96-jamkovém formátu (PALME a EME) pro separaci amfetaminů a vybraných katinonů z mateřského mléka. Mezi hlavní cíle této práce patří:

- Vývoj extrakčních podmínek pro metodu PALME a EME
- Validace extrakčních metod následovaných UHPLC-MS/MS analýzou
- Porovnání obou metod z hlediska výtěžnosti a dalších parametrů
- Analýza reálných vzorků

4 Experimentální část

4.1 Chemikálie

Methanol, kyselina mravenčí (98-100%), acetonitril (všechny LC-MS čistota), kyselina chlorovodíková (0,1M), hydroxid sodný (97%), dodecylacetát (DDA), dihexylether (DHE), trioktylamin (TOA), 2-nitrofenyl(oktyl)ether (NPOE), di(ethylhexyl)fosfát (DEHP), bis(2-ethylhexyl)fosfit (DEHPi) byly objednány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Rovněž zásobní methanolvé roztoky amfetaminu, metamfetaminu, 3,4-methylenedioxy-N-metamfetaminu o koncentraci 1 mg/ml a jejich deuterované vnitřní standardy d_5 -AMF o koncentraci 0,1 mg/ml, d_5 -MAMF a d_5 -MDMA o koncentraci 0,5 mg/ml byly objednány od firmy Merck (Darmstadt, Německo). Zásobní methanolvé roztoky (cca 0,5 ml) kationů: felfedron (4-FMC), methylon (METH), butylon (BUT), methylenedioxyprovaleron (MDPV), mefedron (MEPH), α -PVP, bufedron, 3-CMC, α -PHP, ethylon, 4-MEC, pentedron, pentylon, pyrovaleron a deuterované standardy d_7 -MEPH a d_8 -MDPV vše o koncentraci 0,5 mg/ml byly poskytnuty laboratoří forenzní analýzy biologicky aktivních látek VŠCHT v Praze. Ultračistá voda (dále jen voda) byla vyrobena Millipore purifikačním systémem (Merck-Millipore, Darmstadt, Německo).

4.2 Příprava roztoků a pufrů

Z dodaných methanolvých zásobních roztoků jednotlivých analytů a vnitřních standardů ve výše uvedených koncentracích byly odpovídajícím naředěním stejným rozpouštědlem připraveny pracovní roztoky analytů (0,015-20 μ g/ml) a vnitřních standardů (2,5 μ g/ml). Takto připravené roztoky byly uchovávány v -20 °C a používané po dobu 14 dní.

Pro nastavení potřebného pH donorové a akceptorové fáze byly připraveny následující roztoky: roztok 40mM NaOH (pH 12,6) byl připraven jeho navážením a rozpuštěním ve vodě, roztok 20mM HCOOH (pH 2,74) byl připraven naředěním koncentrované kyseliny mravenčí do vody a roztok 10mM HCl (pH 2,0) byl připraven naředěním koncentrované HCl do vody.

4.3 Mateřské mléko

Blankové vzorky MM byly získány od zdravých dárců v rozmezí 14 dní až 12 měsíců od zahájení kojení (7 různých vzorků matrice). Tyto vzorky byly po odebrání uchovány v lednici a do 12 hodin byly hluboce zmrazeny. Pro experimenty bylo použito

směsné mléko z těchto vzorků MM. Dále bylo ve studii použito 6 reálných vzorků MM od kojících matek, které byly na oddělení poporodní péče ve Všeobecné fakultní nemocnici v Praze, ve Fakultní nemocnici Hradec Králové a v oblastní nemocnici Kolín. Vzorky mléka byly získány od případu pozitivního AMF/MAMF nálezu ve smolce novorozence (Vzorek č.1), od matky, která přiznala nedávné užití MAMF (Vzorek č.2), nebo od matek, které přiznaly svou historii užívání MAMF (Vzorek č. 3-6). Všechny vzorky byly odebrány 24-72 hodin od narození novorozence. Jednalo se o klinické vzorky, které byly již analyzovány a určeny k likvidaci. Pro účely této práce byly vzorky plně anonymizovány. Dále bylo k dispozici 5 kontrolních vzorků s neznámou koncentrací, které byly připraveny úsekem klinické a forenzní toxikologie v rámci Ústavu klinické biochemie a diagnostiky, Fakultní nemocnice Hradec Králové.

4.4 UHPLC-MS/MS

Při vývoji metody pro stanovení amfetaminů a 14 katinonů jsme vycházeli z metody pro stanovení AMF, MAMF a MDMA v moči, která byla již na pracovišti vyvinuta. Analýza byla provedena na UHPLC-MS/MS přístroji Agilent 1290 Infinity II s trojitým kvadrupólem jako MS (6400 sérii) s využitím Jet Stream elektrospreje a MassHunter softwaru (Agilent, Santa Clara, CA, USA). Chromatografické separace bylo dosaženo na analytické koloně Luna Omega 1,6 μm Polar C18 (100 \times 2,1 mm, 1,6 μm). Mobilní fáze byla tvořená 0,1% kyselinou mravenčí (složka A) a acetonitrilem (složka B), pro eluci byl použit gradientový mód. Ionizace probíhala elektrosprejem v pozitivním módu. Hmotnostní spektrometr byl laděn automaticky.

Pro kvantifikaci analytů byly použity deuterované vnitřní standardy d_5 -AMF, d_5 -MAMF, d_5 -MDMA, d_7 -MEPH a d_8 -MDPV. Pro kvantifikaci jsme použili SRM přechod, jednotlivé přechody jsou zmíněny v tabulce 1.

Tabulka 1: SRM přechody, CE=kolizní energie, IS=vnitřní standard.

Analyt	Prekurzorový ion [Da]	Produktový ion [Da]	CE [eV]
MDPV	276,1	126,1	32
		122	24
α -PHP	246,2	140,1	28
		91,1	28
Pyrovaleron	246	175,1	16
		126,1	32
Pentylon	236	188,1	20
		175,1	24
α -PVP	232,1	105	32
		91	28
Ethylon	222,1	174,1	20
		91,1	48
Butylon	222	146,1	32
		131,1	44
Methylon	208	160	20
		132,1	32
d ₅ -MDMA	199,1	165,1	12
		107	28
d ₅ -MAMF	155,1	121,1	8
		92,1	24
3-CMC	198,1	180	12
		145,1	20
MDMA	194,1	163	12
		105	28
4-MEC	192,1	174,1	12
		144,1	36
Pentedron	192	132,1	20
		91	28
Flefedron	182	164,1	12
		149	24
Mefedron	178,1	145,1	24
		91	40
Bufedron	178	131,1	24
		91	32
MAMF	150,1	119,1	8
		91	24
d ₅ -AMF	141,1	124,1	8
		96,1	16
AMF	136,1	119,1	8
		91,1	20
d ₇ -MEPH	185,1	152,0	27
		149,0	29
d ₈ -MDPV	284,1	134,0	37
		213,1	25
		183,0	27

4.5 PALME

Zařízení pro provedení metody PALME se skládá z 96-jamkové donorové destičky vyrobené z polypropylenu s 0,5ml objemem každé jamky (Agilent, Santa Clara, CA, USA) a z 96-jamkové akceptorové filtrační destičky s PVDF filtry (0,45 μm) (Millipore Ltd, Carrigtowhill, Irsko), jež slouží jako podpora pro vznik kapalně membrány. Nakonec byla přiložena aluminiová folie a vrchní víko pro zabránění odpařování akceptorového roztoku během extrakce. Celé schéma tohoto zařízení je znázorněno na obrázku 10.

Před vlastní extrakcí byly nanесeny 3 μl organického rozpouštědla na vnější filtrační membránu jamky akceptorové destičky. Poté byly jamky donorové destičky naplněny roztokem vzorku o objemu 125 μl , který byl alkalizován 125 μl pufru. Na závěr bylo pipetováno 100 μl akceptorové fáze do příslušných akceptorových jamek. Celá tato sestava byla třepána při 950 ot/min na zařízení Vibramax 100 (Heidolph, Kellheim, Německo) po určený čas. Po proběhlé extrakci byl extrakt buď ihned analyzován nebo před analýzou ještě ředěn (1:4) 20mM kyselinou mravenčí. Každá jamka donorové i akceptorové destičky slouží k jednorázovému použití.

Podmínky pro provedení PALME byly optimalizovány za použití čistého donorového roztoku či blankové matrice (spikované analyty na finální koncentraci 100 ng/ml). Pro iniciační experiment (optimalizace SLM) byly použity následující parametry: donorová fáze v každé jamce se skládala ze 125 μl 40mM NaOH a 125 μl čisté vody spikované 2,5 μl pracovního roztoku analytů (směs AMF, MAMF a MDMA) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$ a 2,5 μl pracovního roztoku vnitřních IS standardů (směs d_5 -AMF, d_5 -MAMF a d_5 -MDMA) o koncentraci 5 $\mu\text{g/ml}$, akceptorová fáze obsahovala 100 μl 20mM HCOOH, rychlost třepání byla nastavena na 950 ot/min a jako extrakční čas byl zvolen 60minutový interval. DHE, DDA, DEHPI, DHE s 1% přídatkem TOA, DDA s 1% přídatkem TOA a DEHPi s 1% přídatkem TOA byly testovány jako organická rozpouštědla pro SLM. Pro 2 nejlepší rozpouštědla byla optimalizace provedena na matrici směsného mateřského mléka. Všechny tyto experimenty byly provedeny ve 4 opakováních pro každé rozpouštědlo (n=4).

Další parametry byly optimalizované při extrakci z matrice. Optimalizováno bylo složení akceptorové fáze, kdy byla na začátku zkoušena 20mM HCOOH (pH 2,74) a jako kyselější akceptor i 10mM HCl (pH 2,0), složení donorové fáze, kde byl kromě

samostatného 40mM NaOH zkoušen i 12% přídavek methanolu a finálně byl optimalizován i extrakční čas v rozmezí 20-90 min.

4.6 EME

EME zařízení se skládá z vodivé nerezové 96-jamkové donorové destičky, z víčka s elektrodami, které byly vyrobené v laboratoři a z akceptorové filtrační destičky, která je totožná jako u metody PALME (PVDF, 0,45 μm , Millipore Ltd, Carrigtohill, Irsko). Do donorových jamiček byl pipetován roztok vzorku (125 μl), který byl okyselený 20mM kyselinou mravenčí (110 μl). Akceptorový roztok byl tvořen rovněž 20mM kyselinou mravenčí (100 μl). Objem rozpouštědla sloužící pro tvorbu SLM je totožný jako u předchozí metody (3 μl). Obě tyto fáze byly propojeny s anodou (akceptorová destička) a katodou (donorová destička) a vlastní extrakce byla zahájena aplikací napětí na donorovou i akceptorovou fázi (ES 0300-0,45, Delta Elektronika BV, Zierikzee, Nizozemí) a třepáním vzorku při rychlosti 1050 ot/min. Extrakční proud v systému EME byl monitorován pomocí Fluke 287 multimetru (Fluke, Everett, WA, USA). Stejně jako u PALME byl výsledný extrakt buď ihned analyzován nebo před analýzou ještě ředěn (1:4) 20mM kyselinou mravenčí. Zatímco každá jamka 96-jamkové akceptorové destičky je určena pro jedno použití, vodivá donorová destička a vrchní víčko s elektrodami jsou určeny pro použití opakované. Pro prevenci přenosu, tzv. „carry-over“ efektu mezi vzorky je nutno destičku důkladně umýt okamžitě po uskutečněné extrakci za pomoci Milli-Q vody a ethanolu.

Při optimalizaci extrakčních podmínek bylo nejprve vybráno vhodné organické rozpouštědlo pro SLM, tato optimalizace probíhala při extrakci ze standardního vzorku (100 ng/ml) bez matrice. Byla zkoušena následující rozpouštědla: NPOE, NPOE s 10% přídavkem DEHP (m/m), DEHPi a NPOE v kombinaci s DEHPi (v poměru 1:1, m/m). Optimalizace dalších parametrů byla provedena z matrice MM. Dalším optimalizovaným parametrem bylo vložené napětí (30-75 V). Nakonec byla testována nejvhodnější délka extrakce, kdy byly analyty extrahovány v 5minutových intervalech až do celkového času 30 min při rychlosti třepání 1050 ot/min na zařízení Vibramax 100 (Heidolph, Kellheim, Německo).

4.7 Validace

Metody PALME i EME následované UHPLC-MS/MS analýzou byly validovány dle směrnice evropské lékové agentury (EMA) [47]. Do validace byly zahrnuty

následující parametry: selektivita, přesnost, preciznost, výtěžnost, linearita, nejnížší limit kvantifikace (LLOQ), matricové efekty a přenos neboli „carry-over“. Do hodnocení validačních parametrů byly zařazeny všechny amfetaminy (AMF, MAMF a MDMA) a vybrané nejčastěji vyskytované katinony (mefedron, methylon a MDPV).

4.7.1 Selektivita

Selektivita byla hodnocena analýzou blankové matrice MM, kde byly hodnoceny signály (odpověď detektoru) v retenčních časech analytů a vnitřních standardů.

4.7.2 Přesnost a preciznost

Přesnost byla kalkulována jako procentuální odchylka naměřené hodnoty od té referenční. Preciznost je vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka (RSD) získaných dat. Krátkodobá (within-run) i dlouhodobá (between-run) přesnost a preciznost byly hodnoceny z analýzy 5 vzorků na 3 koncentračních hladinách spikované matrice MM (3; 30 a 300 ng/ml), které pokrývají celý rozsah kalibrační přímky. Dlouhodobá přesnost a preciznost byly hodnoceny ze 3 analýz ve 2 různých dnech.

4.7.3 Výtěžnost

Výtěžnosti byly testovány na nízké (3 ng/ml), střední (30 ng/ml) a vysoké (300 ng/ml) koncentrační hladině kalibračního rozsahu (n=6 pro každou hladinu). Výtěžnost byla vypočítána z poměru plochy píku blankové matrice MM spikované před a po extrakci.

4.7.4 Linearita (kalibrační přímky)

Linearita byla testována v koncentračním rozsahu 0,5 - 400 ng/ml (9 kalibračních bodů). Kalibrační křivky byly připraveny přidávkem standardů testovaných analytů (2,5 µl) do blankové směsné matrice MM. Pro získání nejvhodnějšího kalibračního modelu byla použita nevážená a vážená ($1/x$ a $1/x^2$) lineární regrese.

4.7.5 Matricové efekty

ME byly hodnoceny ze 7 různých vzorků mateřského mléka na třech koncentračních hladinách (0,3; 30 a 300 ng/ml). Tento parametr (vyjádřen v %) byl vypočítán z poměru plochy píku blankové matrice MM spikované po extrakci a z plochy píku standardního roztoku analytů. Byly hodnoceny individuální matricové efekty pro každou sloučeninu a rovněž matricové efekty normalizované na vnitřní standard. Variační koeficient pro individuální i normalizované ME by neměl překročit limit ± 15 %.

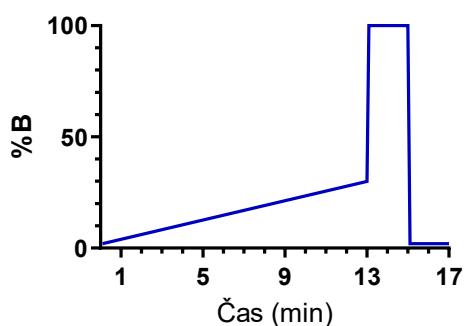
4.7.6 Carry-over (přenos)

Pro hodnocení přenosu byl po vzorcích o vysoké koncentraci analytů nastříkovan vzorek čistého rozpouštědla, ve kterém byl v retenčních časech analytů hodnocen případný signál. Tento signál by neměl být vyšší než 20 % limitu kvantifikace a u IS vyšší než 5 %.

5 Výsledky a diskuze

5.1 UHPLC-MS/MS

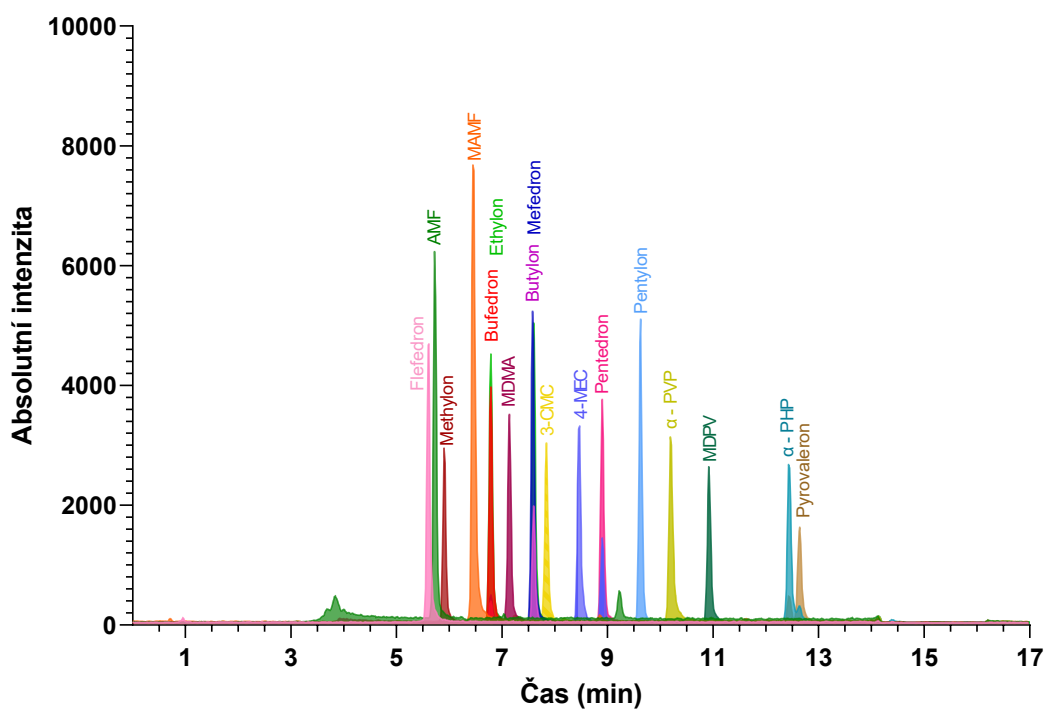
Přestože byla použita MS detekce, bylo potřeba některé látky separovat, jelikož jsou isobarické, a navíc poskytovaly velmi podobné fragmenty (bufedron vs mefedron, ethylon vs butylon, 4-MEC vs. pentedron, α -PHP vs. pyrovaleron), přičemž nejtěžší byla separace α -PHP a pyrovaleronu. Co se týče složení mobilní fáze, byl testován čistý nebo okyselený acetonitril jako složka B a dále byl optimalizován vhodný gradient. Optimálních podmínek bylo dosaženo za použití gradientu uvedeného na obrázku 12. Souhrnné optimální podmínky UHPLC-MS/MS jsou shrnuty v tabulce 2 a reprezentativní chromatogram z mateřského mléka po PALME extrakci je uveden na obrázku 13.



Obrázek 12: Gradientová eluce.

Tabulka 2: Optimální podmínky metody UHPLC-MS/MS.

Podmínky pro UHPLC separaci	
Analytická kolona	kolona Luna Omega 1,6 µm Polar C18 (100 × 2,1 mm)
Mobilní fáze	0,1% FA a okys. ACN
Průtok	0,3 ml/min
Nástřik	3 µl
Teplota – kolona	30 °C
Teplota – autosampler	10 °C
Podmínky pro MS/MS	
Teplota plynu	330 °C
Průtok plynu	6 ml/min
Nebulizér	25 psi
Teplota výhřevného plynu	400 °C
Průtok výhřevného plynu	11 l/min
Kapilára – pozitivní mód	3000 V
Kapilára – negativní mód	3500 V
Napětí trysky – pozitivní mód	0 V
Napětí trysky – negativní mód	500 V



Obrázek 13: Reprezentativní chromatogram – hladina 0,5 ng/ml extrahováno z MM metodou PALME.

5.2 Optimalizace PALME

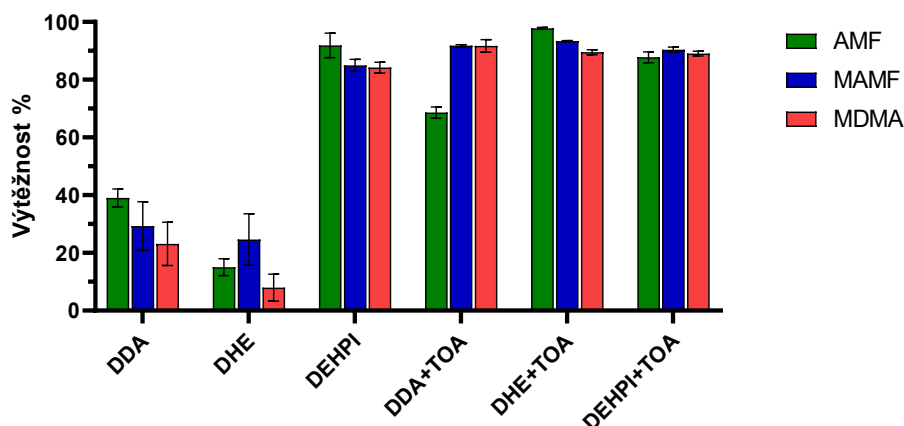
Pro optimalizaci byly zvoleny 3 modelové analyty (AMF, MAMF, MDMA), zbylé analyty (katinony) byly analyzovány s použitím finálních podmínek. Při optimalizaci jednotlivých parametrů extrakce jsme vycházeli z publikace, jež byla zaměřena na extrakci nových psychoaktivních látek z plazmy [7]. Mezi zmíněnými analyty bylo také několik katinonů (methylon, pentedron, MDPV) a vzhledem k jejich strukturální podobnosti s amfetaminy jsme předpokládali obdobné extrakční podmínky. Vardal et al. použili pro extrakci nových psychoaktivních látek následující podmínky: SLM DDA+TOA 1 %, 40mM NaOH jako donor, 20mM HCOOH jako akceptor, doba extrakce 120 min, intenzita třepání 900 ot/min. V souvislosti se srovnatelnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (zejména log P a pKa) jsme při optimalizaci použili shodné složení donorového roztoku (40mM NaOH) a akceptorového roztoku (20mM HCOOH).

5.2.1 Výběr SLM

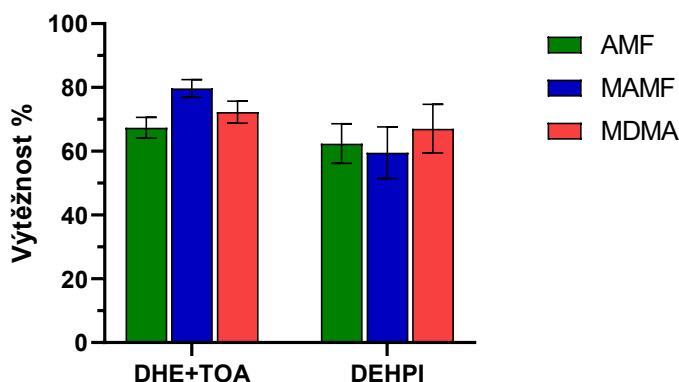
Jednotlivá organická rozpouštědla při optimalizaci SLM byla vybrána jednak na základě výše zmíněné publikace [7] (DDA a DHE), a dále jsme se, na základě polaritě našich analytů, rozhodli vyzkoušet také DEHPi, který byl doposud studovaný jen jako rozpouštědlo pro polárnější látky v metodě EME [69]. Při prvotním vývoji metody PALME byly autory pozorovány problémy v souvislosti s nežádoucími vazbami mezi složkami vzorku a PVDF membránou [60]. Tento jev byl úspěšně odstraněn přidáním 1 % TOA do organického rozpouštědla [7]. Z těchto důvodů byl do optimalizace zahrnut i 1% přídavek TOA do všech námi zvolených rozpouštědel. Co se týče délky extrakce jsme jako kompromis napříč různými studiemi a také na základě našich vlastních zkušeností zvolili 60minutový interval. Na porózní filtr každé jamky byly pipetovány 3 μ l rozpouštědla, tento objem byl zvolen na základě předchozích zkušeností s PALME a dále již nebyl optimalizován [61].

Nejlepší výtěžnosti všech testovaných amfetaminů bylo dosaženo při použití DHE s přídatkem TOA a čistého DEHPi. Srovnatelná výtěžnost MAMF a MDMA byla pozorována rovněž u DDA s přídatkem TOA, ovšem výtěžnost AMF byla v porovnání s předchozími rozpouštědly nižší. Z obrázku 14 je patrné, že přídavek TOA do DDA či DHE výrazně zlepšil výtěžnost amfetaminů, zatímco v případě DEHPi byly výtěžnosti srovnatelné s čistým rozpouštědlem. Pro další optimalizaci byly použity DHE s 1 % TOA a čistý DEHPi. Na základě následné extrakce provedené z matrice mateřského mléka

(Obrázek 15), s ohledem na výtěžnost a variační koeficient, byl jako SLM vybrán DHE s 1% přídavkem TOA.



Obrázek 14: Výtěžnost pro jednotlivé SLM z pufru.



Obrázek 15: Výtěžnost pro DHE+TOA a DEHPi z mateřského mléka.

5.2.2 Přídavek methanolu do donorové fáze

Jak je patrné z obrázku 15, výtěžnosti z mateřského mléka byly pro testované amfetaminy (zejména pro AMF) nižší než při extrakci z vodného vzorku bez matrice (Obrázek 14). Podobný trend pozorovali i Ho et al. v případě extrakce bazických látek (amfetamin, petidin, promethazin, metadon a haloperidol) z plazmy, kde snížení extrakce bylo pravděpodobně způsobeno vazbou analytů na složky matrice [70]. Pro rozrušení těchto (hydrofobních a iontových) vazeb přidali do donorové fáze MeOH, což vedlo k podstatnému zvýšení výtěžností (srovnatelných s extrakcí z vody).

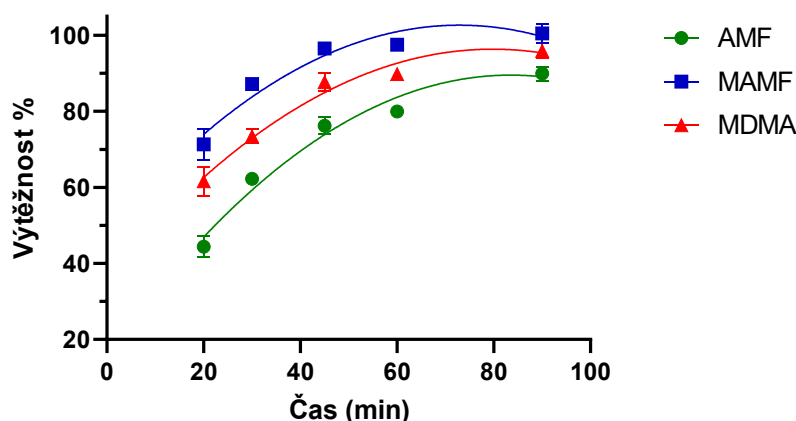
Bohužel v našem případě přidání 12 % methanolu nevedlo ke zvýšení výtěžnosti testovaných amfetaminů a vyšší koncentrace MeOH nebylo možné použít, jelikož způsobovala únik SLM do donorové fáze.

5.2.3 Zvýšení kyselosti akceptorové fáze

Hodnota pH akceptorové fáze by měla být ideálně nastavena tak, aby byly všechny analyty vysoce ionizované, a tudíž zde nebyla hrozba zpětné difuze do fáze donorové. Pilotní nastavení pH bylo při použití 20mM kyseliny mravenčí 2,74 a přestože by při tomto pH měly být všechny testované analyty 100 % ionizovány, rozhodli jsme se vyzkoušet i kyselější prostředí za použití 10mM kyseliny chlorovodíkové s finálním pH akceptoru 2,0. Při použití 10mM HCl však bylo dosaženo spíše nižších extrakčních výtěžností, tudíž byla pro další extrakce používána 20mM HCOOH.

5.2.4 Doba extrakce

Nakonec byla optimalizována délka extrakce, kdy výtěžnosti byly měřeny po 20, 30, 45, 60 a 90 minutách. Jak vyplývá z obrázku 16, je výtěžnost srovnatelná při 45 a 60minutové délce extrakce. Vzhledem k analytu AMF, který měl nejmenší výtěžnost, jež se s přibývajícím časem zvyšovala, byl extrakční čas stanoven na 50 minut.



Obrázek 16: Doba extrakce – PALME.

Při finálních podmínkách PALME byly amfetaminy extrahovány ze 125 μ l MM, jež bylo v donorové jamce smícháno se 125 μ l 40mM NaOH (pH 12,6). Jako SLM bylo použito DHE s 1 % TOA (3 μ l) a akceptorová fáze byla tvořena 100 μ l 20mM kyseliny mravenčí (pH 2,74). Extrakce probíhala při třepání 950 ot/min po dobu 50 minut. Z důvodu lineárního dynamického rozsahu přístroje byl výsledný extrakt před analýzou ředěn 20mM kyselinou mravenčí v poměru 1:4.

S ohledem na variabilitu složení mateřského mléka v průběhu laktčního období jsme hodnotili výtěžnost nejen ze směsné matrice, ale také z 5 různých vzorků MM získaných v rozmezí 1 měsíce až po 16 měsíců od začátku laktace. Extrakční výtěžnost

z různých matric byla srovnatelná a relativní odchylka mezi výtěžnostmi byla méně než 5 %. Vzhledem k tomu bylo ve všech experimentech používáno mléko směsné.

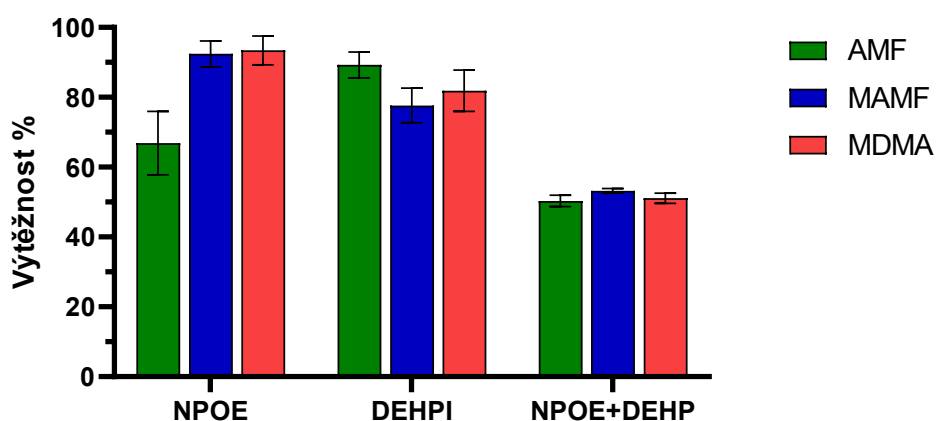
5.3 Optimalizace EME

Stejně jako u PALME byly extrakční podmínky EME optimalizované na 3 zvolených analytech – AMF, MAMF a MDMA. Vzhledem k optimalizovaným podmínkám PALME, byla jako donorový i akceptorový roztok zvolena 20mM kyselina mravenčí a tento parametr nebyl dále optimalizován. Stejně tak intenzita třepání nebyla optimalizována a bylo použito 1050 ot/min na základě předchozích zkušeností s touto extrakční metodou.

5.3.1 Výběr SLM

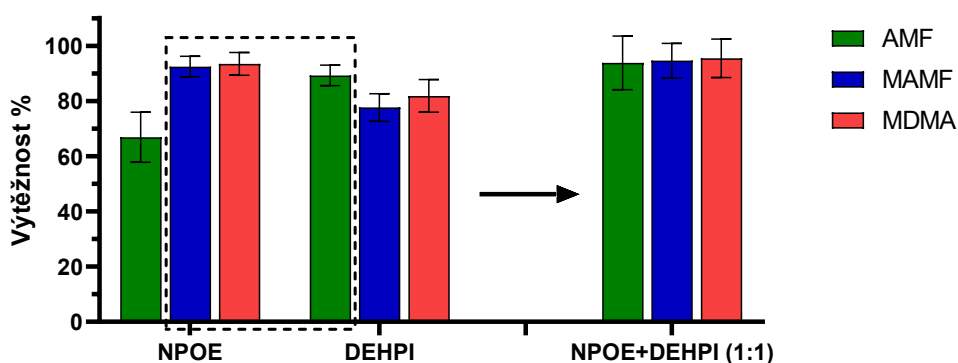
Co se týče volby organického rozpouštědla pro SLM, jsme jako první zvolili NPOE, jakožto nejčastěji používané rozpouštědlo při extrakci bazických látek [64]. Stejně jako u PALME jsme i zde, vzhledem k mírné polaritě našich analytů, vyzkoušeli použití čistého DEHPi [69]. Pro další zvýšení výtěžnosti polárních látek bylo v několika studiích úspěšně vyzkoušeno také přidání ion párového přenašeče DEHP do NPOE, a to v rozmezí 5-25 % tohoto aditiva. Pro náš experiment jsme zvolili 10% přídavek DEHP do NPOE [67]. Pro výběr optimálního organického rozpouštědla byla provedena extrakce sledovaných látek z vodného standardu bez matrice s délkou extrakce nastavenou na 25 minut.

Při extrakci s čistým NPOE bylo dosaženo skvělých výtěžností zejména pro MAMF a MDMA. Naproti tomu přídavek přenašeče DEHP do tohoto rozpouštědla vedl k poklesu výtěžnosti. Tato skutečnost byla již pozorována při extrakci jiných analytů z plazmy [71]. Tento jev může být způsoben tím, že testované analyty, jež nesou kladný náboj mohou být zadržovány v SLM díky negativnímu náboji DEHP (na základě iontových interakcí). Jak můžeme vidět v obrázku 17, jsou zde zaznamenány výborné výsledky nejen při použití čistého NPOE ale i u DEHPi, kdy v případě NPOE byla výtěžnost téměř 100% pro MAMF a MDMA, zatímco u DEHPi téměř 100% pro AMF.



Obrázek 17: Výtěžnost pro jednotlivé SLM z pufru.

Na základě těchto pozorování jsme vyzkoušeli kombinaci těchto dvou rozpouštědel v poměru 1:1, což vedlo k nejlepším dosaženým výsledkům, viz Obrázek 18.



Obrázek 18: Výtěžnost pro NPOE+DEHPi (1:1) z pufru.

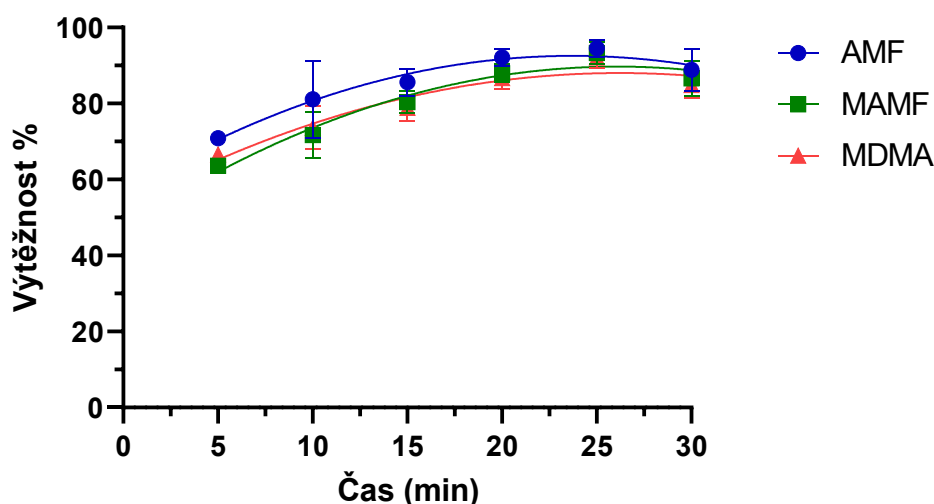
5.3.2 Optimalizace napětí

Vzhledem k předpokladům, že čím vyšší napětí je aplikováno, tím vyšší je výtěžnost extrakce, jsme se snažili použít co nejvyššího napětí, ale zároveň bylo potřeba, aby byl proud, který je systémem generován, menší než $50 \mu\text{A}$ /jamka z důvodu následného rizika elektrolyzy a nestability systému [69]. Vzhledem k tomu, že složení SLM má značný vliv na velikost generovaného proudu, bylo nutné tento parametr optimalizovat pro každé testované organické rozpouštědlo. Například v případě čistého NPOE bylo možné použít napětí 75 V, avšak vybraná směs rozpouštědel NPOE+DEHPi již při 40 V generovala proud vyšší než $50 \mu\text{A}$, a navíc proud s průběhem času dále

stoupal, což poukazovalo na nestabilitu systému. Pro zachování stability systému bylo tedy nutné napětí snížit na optimální hodnotu, kterou bylo 30 V.

5.3.3 Optimalizace času

Jako poslední optimalizovaný parametr byl extrakční čas. Vzhledem k tomu, že byla EME zavedena i pro urychlení předcházející HF-LPME techniky, byly do tohoto experimentu zvoleny kratší časy než u metody PALME [6]. Výtěžnosti z matrice MM byly měřeny po 5 minutách až do celkového času 30 minut. Výtěžnosti všech testovaných analytů se zvyšovaly s délkou extrakčního času a ustálily se při 20 až 25minutovém intervalu (viz Obrázek 19). Proto byla jako finální délka extrakce zvolena 20minutová.



Obrázek 19: Doba extrakce z mléka – EME.

V souvislosti s výše uvedenými experimenty jsme u metody EME zvolili následující podmínky. Analyty byly extrahovány ze 125 μ l MM, jež bylo smíseno se 110 μ l 20mM kyseliny mravenčí v donorové jamce, SLM tvořenou směsí NPOE a DEHPi (1:1, m/m, 3 μ l) do 100 μ l akceptorové fáze tvořené 20mM kyselinou mravenčí. Extrakce probíhala 20 minut při konstantním napětí 30 V a třepání při 1050 ot/min.

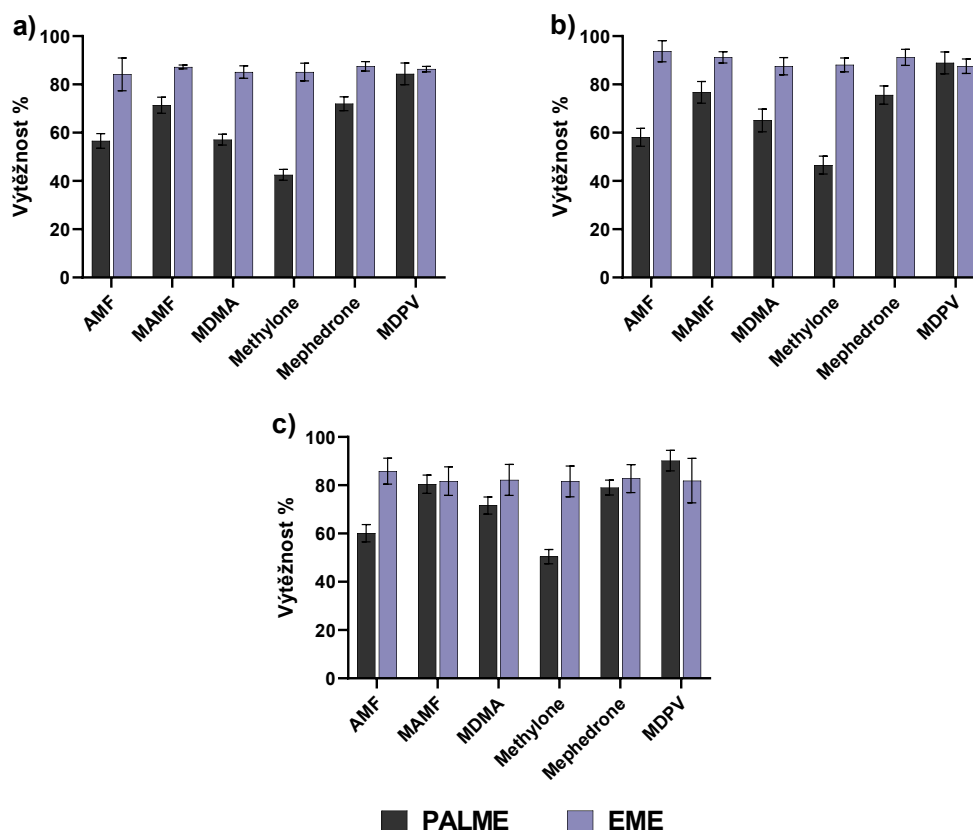
5.4 Validace

5.4.1 Selektivita

Odpovídající selektivita byla potvrzena, jelikož plochy detekované v retenčních časech analytů či vnitřních standardů v blankovém vzorku MM splňovaly limity předepsané EMA [47].

5.4.2 Výtěžnost

U metody PALME se extrakční výtěžnost pohybovala u první hladiny v rozmezí od 50-85 %, u druhé hladiny od 47-89 % a u třetí od 50-90 % pro zvolené analyty. U metody EME byly naměřené výtěžnosti podstatně vyšší a to od 84-91 % pro první koncentrační hladinu, od 88-94 % pro druhou a 81-87 % pro třetí. Grafické znázornění všech získaných výsledků je uvedeno v obrázku 20.



Obrázek 20: Výtěžnosti u metod PALME a EME pro 3 koncentrační hladiny, a) 0,3 ng/ml; b) 30 ng/ml; c) 300 ng/ml.

Z tohoto grafického znázornění můžeme pozorovat, že získané výtěžnosti jsou u většiny analytů ve všech koncentračních hladinách vyšší u EME než u PALME. Pravděpodobně to souvisí s odlišným a efektivnějším mechanismem prostupu analytů skrz SLM u metody EME (elektrokinetická migrace) než u metody PALME (pasivní difuze). Navíc EME potřebuje pro získání dobrých výtěžností kratší čas (20 min) než u metody PALME (50 min), což odpovídá pozorování jinými autory [72, 73]. V menší míře můžeme u metody EME pozorovat snížené výtěžnosti se stoupající koncentrační hladinou, což bylo dříve zaznamenáno i v jiné studii zaměřené na porovnání metod EME a PALME. Tato skutečnost není dosud uspokojivě vysvětlena [72].

5.4.3 Přesnost a preciznost

Jak můžeme vidět v tabulce 3, krátkodobá i dlouhodobá přesnost a preciznost odpovídaly daným kritériím směrnice EMA [47] (naměřené hodnoty se pohybovaly v rozmezí $\pm 15\%$).

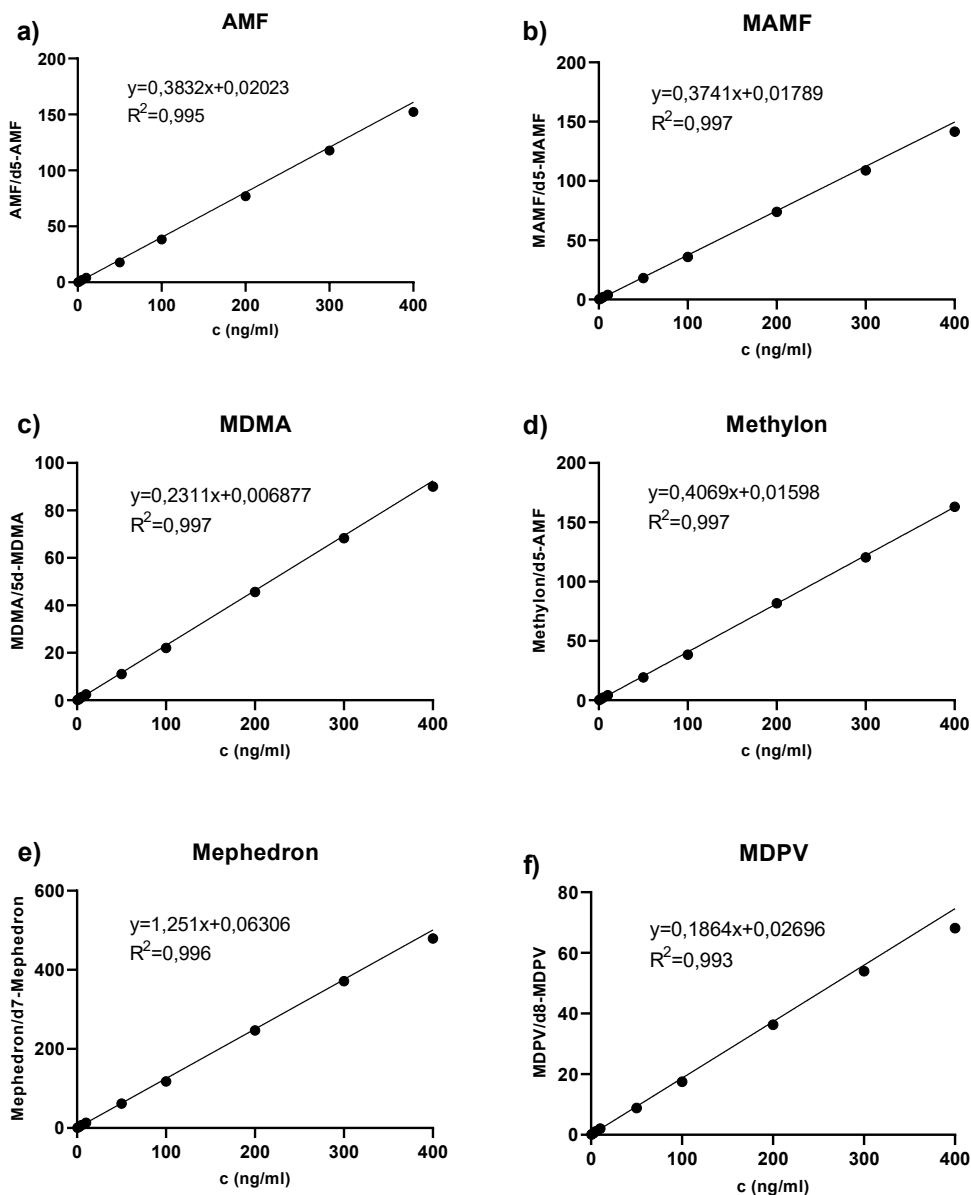
Tabulka 3: Hodnoty preciznosti a přesnosti vybraných analytů v MM (n = 5).

Analyt	Koncentrace (ng/ml)	Krátkodobá		Dlouhodobá	
		Přesnost (%)	Preciznost (R.S.D.)	Přesnost (%)	Preciznost (R.S.D.)
AMF	0,3	98,7	2,9	95,4	6,5
	30	90,5	4,5	93,5	6,0
	300	93,9	3,5	94,6	2,3
MAMF	0,3	98,4	2,2	100,5	2,5
	30	93,8	4,1	94,9	4,9
	300	90,1	2,6	91,6	2,6
MDMA	0,3	98,4	2,5	100,9	3,6
	30	95,0	4,1	95,9	4,4
	300	91,6	2,4	92,6	3,0
METH	0,3	105,4	2,7	103,4	3,2
	30	100,8	4,7	95,9	5,6
	300	94,7	2,5	96,7	3,1
MDPV	0,3	108,2	2,1	103,3	2,7
	30	107,4	3,6	106,1	4,3
	300	97,4	3,1	97,2	4,8
MEPH	0,3	104,7	1,4	102,3	3,6
	30	99,7	4,2	104,6	4,3
	300	95,6	2,7	99,2	4,6

AMF – amfetamin, MAMF – metamfetamin, MDMA – 3,4-methylenedioxy-N-metamfetamin, METH – methylon, MDPV – methylenedioxyprovaleron, MEPH – mefedron

5.4.4 Linearita (kalibrační přímky)

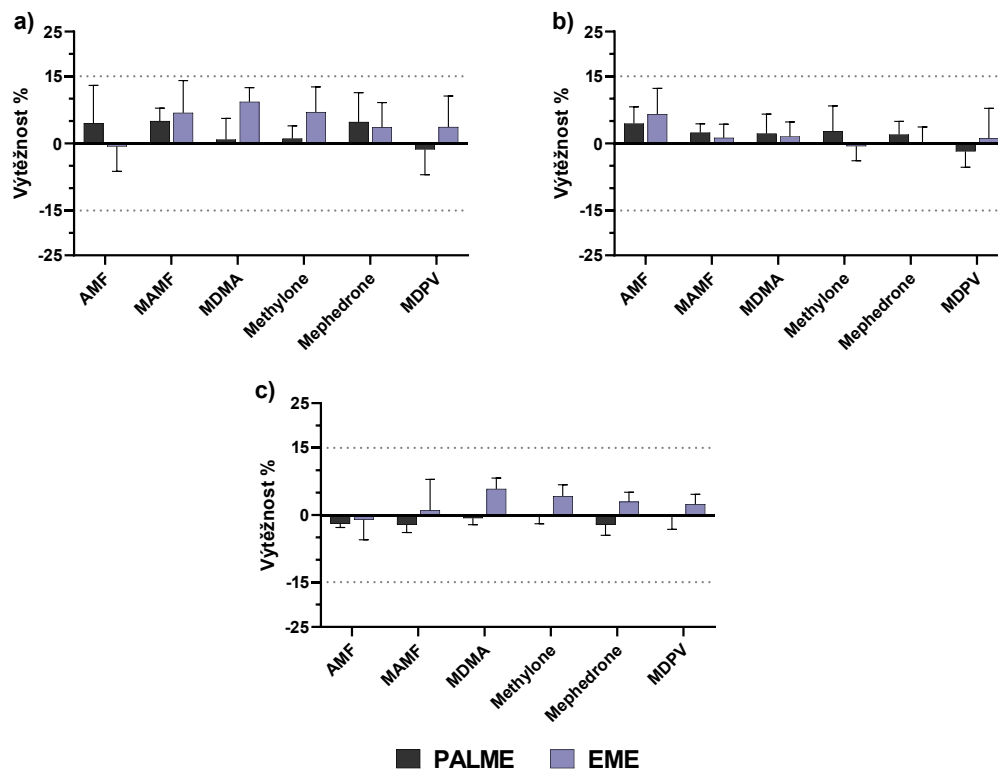
Obě metody byly lineární v koncentračním rozsahu (0,5-400 ng/ml). Získané kalibrační body jsou proloženy lineární regresní křivkou s vážením $1/x^2$. Grafické znázornění kalibračních křivek získaných po extrakční metodě PALME jsou uvedeny v obrázku 21. Kalibrační křivky po metodě EME byly velmi blízké těmto křivkám, a tak není jejich grafické zobrazení vloženo. Determinační koeficienty R^2 byly u obou metod vyšší než 0,993 pro všechny testované analyty. Nejnižší bod kalibrační přímky (0,5 ng/ml) představuje zároveň nejnižší limitní hodnotu kvantifikace (LLOQ).



Obrázek 21: Kalibrační křivky získané po extrakční metodě PALME.

5.4.5 Matricové efekty

U obou metod byly hodnoty absolutních ME stejně jako hodnoty ME normalizovaných na vnitřní standard $\pm 15\%$. V případě normalizovaných hodnot ME byl variační koeficient (RSD) u obou metod menší než 8% , což splňuje podmínky EMA [47]. Srovnání absolutních hodnot ME v případě obou extrakčních metod je uvedeno v obrázku 22.



Obrázek 22: Matricové efekty.

5.4.6 Carry-over efekt (přenos)

V čistém rozpouštědle nastříknutém po vzorku s vysokou koncentrací analytů nebyl zaznamenán žádný signál v retenčních časech těchto analytů.

5.5 Reálné vzorky a vzorky s neznámou koncentrací

Pro ověření praktické použitelnosti metod PALME a EME byly na závěr provedeny analýzy kontrolních (s neznámou koncentrací) a reálných vzorků. Všechny naměřené hodnoty u vzorků s neznámou koncentrací se pohybovaly v porovnání s těmi přidávanými v rozmezí $\pm 15\%$ kromě 4 hodnot u EME a 3 hodnot u PALME ($\pm 20\%$) a 1 hodnoty u obou metod, kde byla odchylka $\pm 30\%$ (vzorek č. 5, methylon).

V žádném ze 6 testovaných reálných vzorků jsme z celkových 14 vybraných kationů nedetekovali ani jeden a pouze 2 vzorky byly pozitivní na testované amfetaminy, konkrétně na AMF a MAMF. Zatímco v jednom pozitivním vzorku jsme se pohybovali ve velmi nízkých koncentracích ($< 5\text{ ng/ml}$), ve druhém bylo detekováno více než 300 ng/ml MAMF a cca 80 ng/ml AMF. Koncentrace, jež byly stanoveny v extraktech po EME či PALME u kontrolních i reálných vzorků jsou srovnatelné (viz tabulky 4 a 5).

Tabulka 4: Naměřené koncentrace u kontrolních vzorků s neznámou koncentrací pro vybrané analyty.

	c [ng/ml]	AMF	MAMF	MDMA	METH	MEPH	MDPV
Vzorek č. 1	Přidaná	50	200	30	350	20	150
	EME	51,9 ± 0,3 (104 %)	191 ± 2,8 (96 %)	35,5 ± 0,9 (118 %)	363,3 ± 24,5 (104 %)	21,1 ± 1,8 (105 %)	160,7 ± 5,8 (107 %)
	PALME	49,1 ± 2,5 (98 %)	193,5 ± 6,4 (97 %)	34,4 ± 1,8 (115 %)	327,3 ± 21,1 (94 %)	21,0 ± 0,9 (105 %)	168,0 ± 7,9 (112 %)
Vzorek č. 2	Přidaná	125	150	160	15	440	475
	EME	118,7 ± 3,5 (95 %)	133,0 ± 1,4 (89 %)	147,7 ± 0,6 (92 %)	16,5 ± 7,8 (110 %)	383,7 ± 1,5 (87 %)	468,7 ± 4,5 (99 %)
	PALME	119,0 ± 4,6 (95 %)	136,5 ± 2,1 (91 %)	147,0 ± 8,0 (92 %)	16,0 ± 1,1 (106 %)	407,3 ± 8,7 (93 %)	509,3 ± 24,6 (107 %)
Vzorek č. 3	Přidaná	400	75	200	1000	75	45
	EME	344,0 ± 20,7 (86 %)	75,0 ± 1,9 (100 %)	190,3 ± 6,4 (95 %)	1116,7 ± 90,2 (112 %)	69,8 ± 2,8 (93 %)	46,5 ± 1,3 (103 %)
	PALME	341,0 ± 10,6 (85 %)	66,7 ± 1,5 (89 %)	189,7 ± 3,1 (95 %)	1040,0 ± 10,0 (104 %)	72,6 ± 1,5 (97 %)	50,1 ± 1,0 (111 %)
Vzorek č. 4	Přidaná	250	300	70	80	5	110
	EME	207,3 ± 3,8 (83 %)	246,5 ± 0,7 (82 %)	62,3 ± 0,7 (89 %)	79,3 ± 6,9 (99 %)	4,1 ± 0,2 (82 %)	113,3 ± 3,5 (103 %)
	PALME	202,3 ± 4,6 (81 %)	255,5 ± 10,6 (85 %)	61,8 ± 0,7 (88 %)	75,6 ± 4,1 (95 %)	3,9 ± 0 (79 %)	119,7 ± 2,5 (109 %)
Vzorek č. 5	Přidaná	75	15	300	5	600	300
	EME	64,3 ± 2,1 (86 %)	14,9 ± 0,8 (99 %)	261,3 ± 17,9 (87 %)	3,7 ± 0,5 (74 %)	511,7 ± 24,5 (85 %)	292,0 ± 14,7 (97 %)
	PALME	63,6 ± 2,9 (85 %)	11,84 ± 2,0 (79 %)	262,0 ± 4,0 (87 %)	3,5 ± 0,2 (70 %)	546,0 ± 2,0 (91 %)	317,0 ± 3,0 (106 %)

Znázorněná procenta jsou odchylka od Přidané koncentrace.

AMF-amfetamin, MAMF-metamfetamin, MDMA-3,4-methylendioxy-N-metamfetamin, METH-methylon, MEPH-mefedron, MDPV- methylendioxyprovaleron.

Tabulka 5: Naměřené koncentrace reálných vzorků pro vybrané analyty.

	c [ng/ml]	AMF	MAMF	MDMA	METH	MEPH	MDPV
Vzorek č. 1	EME	79,2	331,3	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	PALME	75,2	332,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Vzorek č. 5	EME	1,0	4,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	PALME	1,0	4,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

AMF-amfetamin, MAMF-metamfetamin, MDMA-3,4-methylendioxy-N-metamfetamin, METH-methylon, MEPH-mefedron, MDPV- methylendioxyprovaleron, n.d. - nedetekováno

6 Závěr

V této práci byly pro stanovení amfetaminů v mateřském mléce poprvé použity mikroextrakční techniky PALME a EME. Experimentální podmínky těchto metod byly optimalizovány ve smyslu výběru vhodného SLM, složení donorové a akceptorové fáze, délky extrakce a u EME rovněž velikosti vloženého napětí. Nejvyšších výtěžností bylo u metody PALME dosaženo s DHE s 1% přídavkem TOA jako organickým rozpouštědlem pro SLM a u EME byla zvolena kombinace NPOE s DEHPi. Extrakce byly následovány analýzou akceptorové fáze za pomoci metody UHPLC-MS/MS a celý tento proces byl poté validován. Obě metody poskytly relativně rychlou a účinnou úpravu vzorků a byly rovněž aplikovány na kontrolní a reálné vzorky pro ověření jejich praktické použitelnosti. Obě metody poskytly spolehlivé a srovnatelné výsledky. EME nabízí rychlou a účinnou extrakci s dobrým přečištěním vzorku, nicméně její limitací zůstává fakt, že potřebné vybavení pro extrakci není komerčně dostupné. Naproti tomu PALME, jež rovněž nabízí skvělé přečištění vzorku a obstojné výtěžnosti je díky své komerční dostupnosti snáze aplikovatelná do rutinních laboratoří, vyžaduje ale delší extrakční čas.

7 Seznam citované literatury

1. Santos, Wilson José Ramos, and Bruno Spinosa De Martinis. "Psychoactive Substances in Human Breast Milk: A Review of Analytical Strategies for Their Investigation." *Bioanalysis*, vol. 12, no. 17, 2020, p. 1263-1274.
2. Silveira, Gabriela de Oliveira, et al. "Development of a Method for the Determination of Cocaine, Cocaethylene and Norcocaine in Human Breast Milk Using Liquid Phase Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Forensic Science International*, vol. 265, 2016, p. 22-28.
3. Fríguls, Bibiana, et al. "A Comprehensive Review of Assay Methods to Determine Drugs in Breast Milk and the Safety of Breastfeeding When Taking Drugs." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 397, no. 3, 2010, p. 1157-1179.
4. Chalavi, Soheila, et al. "Recent Advances in Microextraction Procedures for Determination of Amphetamines in Biological Samples." *Bioanalysis*, vol. 11, no. 5, 2019, p. 437-460.
5. Joya, Xavier, et al. "Maternal and Neonatal Hair and Breast Milk in the Assessment of Perinatal Exposure to Drugs of Abuse." *Bioanalysis*, vol. 7, no. 10, 2015, p. 1273-1297.
6. Bartu, Anne, et al. "Transfer of Methylamphetamine and Amphetamine into Breast Milk Following Recreational Use of Methylamphetamine." *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 67, no. 4, 2009, p. 455-459.
7. Vårdal, Linda, et al. "Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction of New Psychoactive Substances in Plasma and Whole Blood." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2017, vol. 1048, p. 77-84.
8. Mamat, Nor Akma, and Hong Heng See. "Development and Evaluation of Electromembrane Extraction across a Hollow Polymer Inclusion Membrane." *Journal of Chromatography A*, vol. 1406, 2015, p. 34-39.
9. Shadloo, Behrang, et al. "Use of Amphetamine-Type Stimulants in the Islamic Republic of Iran, 2004-2015: A Review." *Eastern Mediterranean Health Journal*, vol. 23, no. 3, 2017, p. 245-256.
10. Malaca, Sara, et al. "Determination of Amphetamine-Type Stimulants in Urine Samples Using Microextraction by Packed Sorbent and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1120, 2019, p. 41-50.
11. Powers, Robert H., and Dorothy E. Dean. "*Forensic Toxicology: Mechanisms and Pathology*." 1. vyd., CRC Press, Taylor & Francis Group, New York 2015. ISBN 9781466581951 (eBook - PDF)
12. Middleberg, Robert A., and Joseph Homan. "Quantitation of Amphetamine-Type Stimulants by LC-MS/MS." *Methods in Molecular Biology*, vol. 902, 2012, p. 105-114.

13. Maurer, Hans H., and Simon D. Brandt. (Eds) *New psychoactive substances: pharmacology, clinical, forensic and analytical toxicology*. Vol. 252. 1. vyd., Springer, Cham, 2019. ISBN 9783030105617 (eBook)
14. Bowden-Jones, Owen, and Dima Abdulrahim. “*Club Drugs and Novel Psychoactive Substances*.” 1. vyd., Cambridge University Press, Cambridge 2020. ISBN 9781911623106 (ebook)
15. Lendoiro, Elena, et al. “An LC-MS/MS Methodological Approach to the Analysis of Hair for Amphetamine-Type-Stimulant (ATS) Drugs, Including Selected Synthetic Cathinones and Piperazines.” *Drug Testing and Analysis*, vol. 9, no. 1, 2017, p. 96-105.
16. Odoardi, Sara, et al. “High-Throughput Screening for New Psychoactive Substances (NPS) in Whole Blood by DLLME Extraction and UHPLC-MS/MS Analysis.” *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1000, 2015, p. 57-68.
17. Barceloux, Donald G. *Medical toxicology of drug abuse: synthesized chemicals and psychoactive plants*. 1.vyd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2012. ISBN 9780471727606
18. PubChem [Internet] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound> [staženo 20.04.2021]
19. Dasgupta, Amitava. (Eds) *Handbook of Drug Monitoring Methods*. 1.vyd., Humana Press Inc., Totowa, 2008. ISBN 9781597450317 (eBook – PDF)
20. Ward, Lauren F., et al. “Improved Chiral Separation of Methamphetamine Enantiomers Using CSP-LC-MS-MS.” *Journal of Analytical Toxicology*, vol. 40, no. 4, 2016, p. 255-263.
21. Corazza, Ornella & Roman-Urrestarazu, Andres. *Handbook of Novel Psychoactive Substances: What Clinicians Should Know About NPS*. 1. vyd., Routledge Taylor&Francis, New York, 2019. ISBN 9781315158082 (ebook)
22. Chomchai, Chulathida, et al. “Transfer of Methamphetamine (MA) into Breast Milk and Urine of Postpartum Women Who Smoked MA Tablets during Pregnancy: Implications for Initiation of Breastfeeding.” *Journal of Human Lactation*, vol. 32, no. 2, 2016, p. 333-339.
23. Karch, Steven, B. (Eds) *Karch's pathology of drug abuse*. 4. vyd., CRC Press, London, 2009. ISBN 9780849378805
24. Alhazmi, Hassan A., et al. “Analysis of Amphetamine and Methamphetamine Contents in Seized Tablets from Jazan, Saudi Arabia by Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS/MS) and Chemometric Techniques.” *Saudi Pharmaceutical Journal*, vol. 28, no. 6, 2020, p. 703-709.
25. Horák, Josef; Linhart, Igor; Klusoň Petr. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. 1. vyd., VŠCHT, Praha, 2004. ISBN 807080548X
26. Charlotte Wells, et al. “Withdrawal Management and Treatment of Crystal Methamphetamine Addiction in Pregnancy: A Review of Clinical Effectiveness and Guidelines.” [online]. Ottawa (ON): *Canadian Agency for*

- Drugs and Technologies in Health*; 2019 Jun 17. Dostupné z: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK546255/>>.
27. Accioni, Francesca, et al. "SUPRAS Extraction Approach for Matrix-Independent Determination of Amphetamine-Type Stimulants by LC-MS/MS." *Talanta*, vol. 182, 2018, p. 574-582.
 28. Gallardo, E., et al. "LC-MS: a powerful tool in workplace drug testing." *Drug Testing and Analysis*, vol. 1, no. 3, 2009, p. 109-115.
 29. Negrusz Adam and Cooper Gail AA. (Eds) *Clarke's Analytical Forensic Toxicology*. 2. vyd., Pharmaceutical Press, London, 2013. ISBN 9780857110541
 30. Flanagan Robert J.; Cuypers Eva; Maurer Hans H.; Whelpton Robin. *Fundamentals of analytical toxicology*. 2. vyd., John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, 2020. ISBN 9781119122371 (epub)
 31. Nemeškalová, Alžběta, et al. "Salting out Assisted Liquid-Liquid Extraction for Liquid Chromatography Tandem-Mass Spectrometry Determination of Amphetamine-like Stimulants in Meconium." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 172, 2019, p. 42-49.
 32. Lappas Nicholas; Lappas Courtney. *Forensic Toxicology Principles and Concepts*. 1. vyd., Academic Press, London, 2015. ISBN 9780128004647 (ebook)
 33. Karch, Steven, B. (Eds) *Drug Abuse Handbook*. 2. vyd., CRC Press, London, 2007. ISBN: 9781420003468
 34. Nováková, Lucie a Douša, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Lucie Nováková, Praha 2013a. ISBN 9788026042433.
 35. Hansen Honoré Steen; Pedersen-Bjergaard Stig. (Eds) *Bioanalysis of Pharmaceuticals*. 1. vyd., John Wiley & Sons, Ltd, West Sussex, 2015. ISBN 9781118716816
 36. Peters, Eric C., et al. "Molded Rigid Polymer Monoliths as Separation Media for Capillary Electrochromatography." *Analytical Chemistry*, vol. 69, no. 17, 1997, p. 3646-3649.
 37. Švec, František. „Monolytické stacionární fáze pro HPLC.“ *Chem. Listy* 98, 2004, p. 232-238.
 38. Klouda, Pavel. *Moderní analytické metody. 2., upr. a dopl. vyd.* Pavel Klouda, Ostrava, 2003. ISBN 8086369072
 39. Gross Jürgen H. *Mass Spectrometry A Textbook*. 3. vyd., Springer, Cham, 2017. ISBN 9783319543987 (eBook)
 40. http://holcapek.upce.cz/teaching/MS_2012/MS01_Uvod.pdf
[staženo 15.03.2021]
 41. XU, Q. Alan a Timothy L. MADDEN (Eds) *LC-MS in Drug Bioanalysis*. 1. vyd., Springer, US, 2012. ISBN 9781461438281 (eBook)

42. Šesták, Vít. *Analytické a bioanalytické hodnocení nových protinádorových léčiv*. Hradec Králové, 2017. 60 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Školitel Petra Kovaříková
43. Reimerová, Petra. *Analýza léčiv a potenciálních léčiv v biologickém materiálu s využitím kapalinové chromatografie*. Hradec Králové, 2020. 125 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Školitel Petra Štěrbová
44. Bavlovič Piskáčková Hana. *Využití LC-MS v bioanalýze antracyklinů a potenciálních kardioprotektiv*. Hradec Králové, 2021. 183 s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Školitel Petra Štěrbová
45. Nováková, Lucie a Douša, Michal *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Lucie Nováková, Praha, 2013b. ISBN 9788026042440
46. Li Wenkui; Zhang Jie; TSE Francis L.S. (Eds) *Handbook of LC-MS Bioanalysis*. 1. vyd., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 2013. ISBN 9781118159248
47. European Medicine Agency., *Guideline on the investigation of bioequivalence 2010*;
Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf
[Zobrazeno 17.2.2021]
48. U.S. Food and Drug Administration, *Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry*. 2018; Dostupné z: [Zobrazeno 17.2.2021]
49. Hansen, Frederik, et al. "Bioanalysis of Pharmaceuticals Using Liquid-Phase Microextraction Combined with Liquid Chromatography–Mass Spectrometry." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 189, 2020, p. 113446.
50. Nováková, Lucie. "Challenges in the Development of Bioanalytical Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Method with Emphasis on Fast Analysis." *Journal of Chromatography A*, vol. 1292, 2013, p. 25-37.
51. Kataoka, Hiroyuki. "Recent Developments and Applications of Microextraction Techniques in Drug Analysis." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 396, no. 1, 2010, p. 339-364.
52. Nováková, Lucie, and Hana Vlčková. "A Review of Current Trends and Advances in Modern Bio-Analytical Methods: Chromatography and Sample Preparation." *Analytica Chimica Acta*, vol. 656, no. 1–2, 2009, p. 8-35.
53. Olsen, Katharina Norgren, et al. "Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction of Psychoactive Analytes: A Novel Approach in Therapeutic Drug Monitoring." *Bioanalysis*, vol. 10, no. 6, 2018, p. 385-395.
54. Ramos, Lourdes. "Critical Overview of Selected Contemporary Sample Preparation Techniques." *Journal of Chromatography A*, vol. 1221, 2012, p. 84-98.

55. Saito, Yoshihiro, and Koki Nakagami. "Sample Preparation for the Analysis of Drugs in Biological Fluids." *Handbook of Analytical Separations*, vol. 7, 2020, p. 1-13.
56. Pedersen-Bjergaard, Stig, and Knut Einar Rasmussen. "Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis." *Analytical Chemistry*, vol. 71, no. 14, 1999, p. 2650-2656.
57. Pedersen-Bjergaard, Stig, and Knut Einar Rasmussen. "Bioanalysis of Drugs by Liquid-Phase Microextraction Coupled to Separation Techniques." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 817, no. 1, 2005, p. 3-12.
58. Ghambarian, Mahnaz, et al. "Developments in Hollow Fiber Based Liquid-Phase Microextraction: Principles and Applications." *Microchimica Acta*, vol. 177, no. 3-4, 2012, p. 271-294.
59. Pena-Pereira, Francisco. "Miniaturization in Sample Preparation." *Miniaturization in Sample Preparation*, 2014, p. 191-237.
60. Gjelstad, Astrid, et al. "Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction: Micro-Scale Liquid-Liquid-Liquid Extraction in the 96-Well Format." *Bioanalysis*, vol. 5, no. 11, 2013, p. 1377-1385.
61. Pilařová, Veronika, et al. "One-Step Extraction of Polar Drugs from Plasma by Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction." *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, vol. 1043, 2017, p. 25-32.
62. Pedersen-Bjergaard, Stig, and Knut Einar Rasmussen. "Electrokinetic Migration across Artificial Liquid Membranes." *Journal of Chromatography A*, vol. 1109, no. 2, 2006, p. 183-190.
63. Seidi, Shahram, et al. "Electrokinetic Extraction on Artificial Liquid Membranes of Amphetamine-Type Stimulants from Urine Samples Followed by High Performance Liquid Chromatography Analysis." *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 26, 2011, p. 3958-3965.
64. Huang, Chuixiu, et al. "Organic Solvents in Electromembrane Extraction: Recent Insights." *Reviews in Analytical Chemistry*, vol. 35, no. 4, 2016, p. 169-183.
65. Huang, Chuixiu, et al. "Electromembrane Extraction with Alkylated Phosphites and Phosphates as Supported Liquid Membranes." *Journal of Membrane Science*, vol. 526, 2017, p. 18-24.
66. Drouin, Nicolas, et al. "New Supported Liquid Membrane for Electromembrane Extraction of Polar Basic Endogenous Metabolites." *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 159, 2018, p. 53-59
67. Hansen, Frederik A., et al. "Electromembrane Extraction of Highly Polar Bases from Biological Samples – Deeper Insight into Bis(2-Ethylhexyl) Phosphate as Ionic Carrier." *Analytica Chimica Acta*, vol. 1115, 2020, p. 23-32.

68. Skottvoll, Frøydis Sved, et al. "Electromembrane Extraction and Mass Spectrometry for Liver Organoid Drug Metabolism Studies." *Anal. Chem.*, vol. 93, no. 7, 2021, p. 3576-3585.
69. Huang, Chuixiu, et al. "Electromembrane Extraction of Polar Basic Drugs from Plasma with Pure Bis(2-Ethylhexyl) Phosphite as Supported Liquid Membrane." *Analytica Chimica Acta*, vol. 934, 2016, p. 80-87.
70. Tung, Si Ho, et al. "Liquid-Phase Microextraction of Protein-Bound Drugs under Non-Equilibrium Conditions." *Analyst*, vol. 127, no. 5, 2002, p. 608-613.
71. Bavlovič Piskáčková, Hana, et al. "Electromembrane Extraction of Anthracyclines from Plasma: Comparison with Conventional Extraction Techniques." *Talanta*, vol. 223, 2021, 121748.
72. Wan, Libin, et al. "Liquid-Phase Microextraction or Electromembrane Extraction?" *Analytical Chemistry*, vol. 91, no. 13, 2019, p. 8267-8273.
73. Gjelstad, Astrid, et al. "Kinetic Aspects of Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction and Electromembrane Extraction." *Analytica Chimica Acta*, vol. 742, 2012, p. 10-16.