

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**Metody zpracování biologického vzorku při analýze xenobiotik v něm
obsažených**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. PharmDr. Milan Nobilis, CSc.

Hradec Králové 2008

Iva Šenitková

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Milanu Nobilisovi, CSc. za odborné vedení a cenné rady při vypracování této bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a uvedla všechny použité prameny.

Obsah

1	Úvod	4
2	Osud xenobiotik v organismu (1-4)	5
2.1	Absorpce	5
2.2	Distribuce	7
2.3	Metabolické přeměny	8
2.4	Exkrece	10
3	Hlavní druhy biologického materiálu	13
3.1	Krev a její deriváty	13
3.2	Synoviální tekutina	14
3.3	Tkáně, buňky a subcelulární struktury	15
3.4	Moč	15
3.5	Stolice	16
3.6	Žluč	17
3.7	Mozkomíšňní tekutina	17
3.8	Sliny	17
3.9	Vlasy	18
3.10	Pot.....	19
3.11	Mléko.....	20
3.12	Mekonium.....	20
4	Způsoby uchování biomaterie	21
5	Způsoby zpracování biomaterie	24
5.1	Uvolnění analytu z matrice	24
5.2	Odstranění endogenních látek	25
5.3	Derivatizace xenobiotik	25
5.4	Metody extrakce	27
5.4.1	Extrakce kapalina – kapalina (LLE, liquid – liquid extraction)(1)	27
5.4.2	Extrakce na tuhých fázích (SPE, solid phase extraction)(1, 30).....	29
5.4.3	Mikroextrakce tuhými fázemi (SPME, Solid phase microextraction).....	33
5.4.4	Superkritická fluidní extrakce (SFE)	37
5.5	Molecularly Imprinted Polymers (MIPs).....	38
6	Závěr	40
7	Literatura	41

1 Úvod

Analýza xenobiotik v biologickém materiálu je komplexní proces zahrnující odběr a zpracování vzorku, extrakci analytů, které jsou předmětem našeho zájmu a jejich následnou instrumentální analýzu. Analyty, které detegujeme a stanovujeme, jsou v biomatrici ve směsi s nadbytkem endogenních látek, jejichž vliv na analýzu musíme potlačit. K tomu slouží preanalytická příprava vzorku zahrnující řadu operací, které slouží k zakoncentrování analytů v biomatrici a odstranění přítomných balastních látek. Součástí přípravy vzorku je v některých případech modifikace struktury analytů, jejíž cílem je zlepšení detegovatelnosti analytu, zlepšení extrahovatelnosti, zlepšení chromatografického chování, zvýšení stability apod.

Tato bakalářská práce se zabývá popisem vlastností různých biomateriálů, způsobů jejich ukládání, zpracování a způsobů specifického vyjmutí analytů z biomateriálu s cílem dosáhnout co největší návratnosti (recovery) a maximálně potlačit vliv interferujících složek analyzované směsi. Preanalytická příprava vzorku je nesmírně důležitý proces pro většinu bioanalýz, proto je mu věnována značná pozornost. Nachází uplatnění v xenobiochemických a farmakokinetických studiích, v terapeutickém monitorování léčiv, ve forensní analýze, v potravinářství, při antidopingových kontrolách, ale také během sledování stavu životního prostředí.

Na správné volbě a provedení preanalytických operací závisí výsledek celé bioanalýzy. Je rovněž nezbytné znát osud analyzovaného xenobiotika v organismu a podle toho také zvolit vhodnou biomatrici, kde sledujeme analyty. Protože není často možné vybraný biologický materiál okamžitě zpracovávat, musíme znát stabilitu xenobiotika v biomatrici. Testování stability je tedy rovněž významnou preanalytickou operací.

2 Osud xenobiotik v organismu (1-4)

Xenobiotika jsou látky, které nevznikají v lidském organismu, nejsou nutné pro jeho vývoj a neslouží mu jako zdroj energie. V biologických materiálech jsou přítomny v nanogramových až mikrogramových množstvích. Tyto látky mohou být přírodního původu nebo mohou být synteticky vyrobené a podle jejich charakteru je můžeme rozdělit na polární (např. těžké kovy, oxidy) a nepolární (většina organických látek). Jen výjimečně xenobiotika v organismu nepodléhají chemickým, fyzikálním a biologickým změnám a v mnohých případech významně ovlivňují celkový stav organismu. Naopak často je působení biologického systému a cizorodé látky vzájemné. Osud xenobiotik v organismu můžeme rozdělit do čtyř fází: absorpci, distribuci, metabolické přeměny a exkreci

2.1 Absorpce

Absorpce je způsob, kterým cizorodá látka překonává bariéru mezi vnitřním a vnějším prostředím a proniká do organismu. Mezi nejčastější způsoby absorpce xenobiotika u člověka patří:

Absorpce plicemi při vdechování plynů, par kapalin, kapiček aerosolů a prachových částic. V horních cestách dýchacích se část vdechovaných látek může zdržovat. Absorbují se zde především látky rozpustné ve vlhkém povrchu sliznic, a také větší částice tuhých a kapalných látek, které se zachycují na řasinkové výstelce sliznic. Zbytek se dostává s vdechovaným vzduchem až do alveolů a odtud do krve.

Absorpce plynů a par plicemi je velmi rychlá, protože tento orgán je svou stavbou uzpůsoben k efektivní výměně plynů mezi vdechovaným vzduchem a krví. Odpovídá tomu jak neobyčejně velká efektivní plocha, na které k výměně dochází, tak také stavba membrány pneumocytů. Tato membrána je velmi tenká a látky ji překonávají pomocí difúze. Membrána je ovšem pro plyny a páry propustná v obou směrech, takže mezi plynnými molekulami cizorodé látky v plicích a rozpuštěnou látkou v krvi se ustaví rovnovážný stav. Můžeme tedy říci, že čím vyšší bude koncentrace látky v inhalovaném vzduchu, tím vyšší bude i její koncentrace v krvi. Beze zbytku to však platí pouze pro látky s vysokou rozpustností v kapalinách (krvi).

Plicní absorpce tekutých a pevných aerosolů je ovlivněna velikostí částic. Čím menší jsou částice aerosolu, tím hlouběji pronikají do plicní struktury a jsou odolnější k fyziologickým mechanismům, kterými jsou vdechnuté částice odstraňovány z dýchacích cest.

Částice velikosti 5 μm a větší se ukládají v nasofaryngeální oblasti. Z této oblasti mohou být odstraněny např. kýchním nebo čištěním nosu. Rozpustné částice mohou být absorbovány nosním epitelem, případně se mohou rozpustit v mukóze a následně být transportovány do faryngu.

Částice o velikosti 2 až 5 μm se ukládají především v oblasti tracheobronchiální, poté jsou odstraňovány retrográdním pohybem řasinkového epitelu respiračního traktu. Tyto částice mohou být spolknuty a vstřebány z gastrointestinálního traktu.

Částice o velikosti 1 μm a menší pronikají až do alveolárních váčků a odtud jsou přenášeny do krve a lymfatického řečiště po pohlcení alveolárními makrofágy.

Absorpce gastrointestinálním traktem (GIT) nastává při perorálním příjmu cizorodé látky (ingesce). GIT je velmi častou branou vstupu xenobiotika do organismu.

K absorpci xenobiotika do krve dochází podél celého zažívacího traktu, tedy sliznicemi v dutině ústní, v žaludku, v tenkém a tlustém střevě a v konečníku.

Sliznice ústní dutiny je bohatě prokrvena a epiteliální výstelka je poměrně tenká. Při podání léčiv zde dochází k rychlému nástupu účinku. U absorpce ze žaludku je potřeba myslet na jeho kyselé pH (kolem 1,0 – 2,0). Dochází zde často ke kyselé hydrolyze léčiv, případně k vychytávání bazických látek z krve (*ion-trapping*). Tenké střevo má větší absorpční kapacitu než žaludek. To je dáno především velkou absorpční plochou (kolem 200 m^2) a vysokou mírou prokrvení. V tlustém střevě je absorpce naopak výrazně nižší vlivem menší absorpční plochy, nižší motility a tužšího obsahu střeva. Oblast rekta je malá, ale bohatě prokrvená absorpční plocha. Je často využívána pro podání léčiv, když léčivo dráždí žaludek, pacient je po operaci GIT, v bezvědomí nebo dochází k dlouhodobému zvracení.

Většina látek se vstřebává prostou difúzí, pouze některé málo rozpustné látky se dostávají do epiteliálních buněk GIT pomocí pinocytózy.

Absorpce z GIT je ovlivňována řadou faktorů, jako je lipofilita látky, stabilita látky při různém pH, velikost částic u nerozpustných látek, biotransformace

v jednotlivých částech GIT, funkční stav GIT (např. motilita střev nebo vyprazdňování žaludku, prokrvení), věk člověka, ale také interakce daného xenobiotika s jinou látkou (např. mléko zvyšuje absorpci olova). (5)

Absorpce kůže. Neporušená kůže tvoří účinnou bariéru pro vstup většiny xenobiotik. Kůže je tvořena několika vrstvami epitelálních buněk, které tvoří samostatné bariéry. Pro absorpci látky je nejdůležitější průnik přes nejsvrchnější vrstvu zrohovatělých buněk, která se nazývá *stratum corneum*. Touto vrstvou mohou nejlépe procházet např. polární aprotická rozpouštědla a látky v nich rozpustné. Projde-li látka *stratum corneum*, je její další průnik kůží již poměrně rychlý. Ochranná schopnost kůže je tedy velmi oslabena, je-li tato vrchní část pokožky porušena nebo odstraněna. Naopak pokud je tato část pokryta filmem některých polymerů (tzv. biologické rukavice), absorpce pokožkou se velmi sníží.

Lipofilní látky mohou pronikat přes buněčné membrány buněk, naopak hydrofilní látky pronikají přes kanálky potních a mazových žláz. Podíl těchto kanálků však tvoří pouze 0,1-1% povrchu kůže. Další faktory, které ovlivňují absorpci přes kůži jsou např. vlhkost kůže, teplota organismu nebo jeho věk.

Absorpce přes oči. Prakticky všechny kapaliny a pevné látky při vniknutí do oka dráždí. Některé látky ale mohou přes oči proniknout např. do mozku a způsobit otravu. Tato cesta vstupu toxických látek je v běžném životě málo pravděpodobná, ale při práci v laboratoři nebo v provozu přesto velmi významná.

2.2 Distribuce

Distribuce znamená dynamické rozdělení xenobiotika nebo jeho metabolitů do buněk, tkání a orgánů organismu. Závisí na rychlosti přestupu látky z kapilárního řečiště do tkáňových tekutin a také na přestupu z tkáňových tekutin do tkání. Distribuci chemické látky můžeme sledovat klasickými analytickými metodami nebo látku můžeme označit vhodným markerem (radioaktivní izotop, fluorescenční sonda apod.) a využít moderních zobrazovacích metod, z nichž některé umožňují sledovat i dynamiku tohoto procesu.

Distribuce do jednotlivých částí organismu je pro různé látky velmi rozdílná. Je závislá na fyzikálně-chemických faktorech látky, zda pronikla do organismu

jednorázově nebo opakovaně, zda se váže na nějaký nosič atd. Distribuce látky je v každém okamžiku výsledkem její absorpce a exkrece.

Distribuce je ovlivněna především velikostí rozdělovacího koeficientu dané látky. Koeficient udává, v jakém poměru se látka dělí mezi vodní a organickou fází. Tato fyzikální veličina je také jeden z faktorů, který rozhoduje o tom, v jakých orgánech se látka bude hromadit. Místo kumulace xenobiotika (tuková tkáň, játra, ledviny atd.) může být místem toxického účinku, ale nemusí tomu tak být vždy. Často slouží některé tkáně jako specifická depa (např. tuková tkáň pro lipofilní látky). Ukládání látek může významně ovlivnit jejich distribuci, ale také jejich toxické působení na organismus. Látky se z těchto míst totiž mohou uvolňovat ještě dlouho poté, co už organismus není látkou exponován. Některé látky jsou schopné reverzibilní vazby na biomakromolekuly, které mohou sloužit jako depa nebo specifické transportéry. Takovými biomakromolekulami jsou např. plazmatické proteiny albumin (depotní i transportní protein), gama-globulin (vazba antigenu), transferin a ceruloplazmin (vazba kovů), α a β -lipoproteiny (vazba v tučích rozpustných xenobiotik) nebo α_1 kyselý glykoprotein (vazba bazických látek). Xenobiotikum navázané na bílkovinu nemůže být distribuováno do extravaskulárního prostoru a nedochází k filtraci ledvinami.

Častým orgány kumulace xenobiotik jsou játra a ledviny, ale také např. kosti. Distribuce je také významně ovlivněna přítomností biologických bariér. Významnou bariérou je hematoencefalická bariéra a placentární bariéra.

2.3 Metabolické přeměny

Metabolickou přeměnou látky (biotransformací) rozumíme její chemickou přeměnu. K biotransformaci xenobiotik dochází v řadě orgánů. Nejdůležitější metabolickými orgány jsou játra, dále ledviny a plíce.

Produkty metabolismu xenobiotik jsou zpravidla více hydrofilní a snadněji se vylučují z těla. Proto byly biotransformační reakce dlouhou dobu pokládány za reakce detoxikační. Ačkoliv jsou mnohé metabolické produkty (metabolity) opravdu méně toxické než látky výchozí, víme již, že to neplatí univerzálně. Některé reakce mohou naopak vytvářet produkty o vysoké toxicitě. Reakce tohoto typu nazýváme *metabolickou aktivací*.

Na metabolických přeměnách se podílejí biokatalyzátory-enzymy. Metabolické reakce se tradičně dělí do dvou skupin:

I. fáze biotransformace probíhá většinou jako oxidační, redukční nebo hydrolytická reakce.

- **Oxidační enzymy** tvoří velmi početnou a důležitou skupinu. Můžeme je rozdělit do dvou skupin: *monooxygenasy* závislé na cytochromu P-450 a flavinové monooxygenasy a *dioxygenasy* (peroxidasy). Pro svoji aktivitu potřebují donor vodíku (NADPH) a molekulární kyslík
- **Redukční enzymy** jsou lokalizovány především v membránách endoplazmatického retikula, v cytosolu a v bakteriích střevní flóry. Tyto enzymy vyžadují NADPH a NADH jako koenzymy. Redukční reakce jsou organismem obecně využívány méně než reakce oxidační.
- **Hydrolytické enzymy** (např. karboxyesterasy, peptidasy, arylesterasy) odštěpují od substrátu velký fragment, takže změna struktury xenobiotika je rozsáhlejší než u předchozích biotransformačních reakcí. Vyskytují se například v krevní plazmě a v erytrocytech.

II. fáze biotransformace zahrnuje řadu syntetických reakcí, kdy je xenobiotikum nebo jeho metabolit konjugován s příslušnou endogenní látkou za vzniku nových chemických sloučenin, konjugátů. Označení reakce II. fáze biotransformace je poněkud nepřesné, protože jim nemusí předcházet fáze první.

Do této fáze se řadí:

- **Glukuronidace** – enzym glukuronyltransferáza katalyzuje vznik polárních, ve vodě rozpustných glukuronidů, které jsou vylučovány močí nebo žlučí.
- **Sulfatace** – efektivní proces, kdy při reakci katalyzované sulfotransferázami vznikají estery xenobiotika s kyselinou sírovou, které jsou ionizovány a exkretovány hlavně do moči.
- **Acetylace** – kofaktorem je acetyl koenzym A, reakce jsou katalyzovány N-acetyltransferázami. Rychlost acetylace závisí na genetickém polymorfismu člověka. V populaci existují např. „rychlí“ a „pomalí“ acetylátoři isoniazidu
- **Methylace** – má význam především při metabolismu endogenních látek

- **Konjugace s glutathionem (GSH)** – reakce jsou katalyzovány glutathion-S-transferázami a vzniklé konjugáty jsou štěpeny na deriváty cysteinu, acetylovány a vylučovány močí.
- **Konjugace s aminokyselinami** – je důležitá pro metabolismus xenobiotik typu karboxylových a aryloctových kyselin.

Přesné stanovení metabolitů je důležité ze dvou hlavních důvodů. Zaprvé, metabolit má v mnoha případech významně delší biologický poločas než původní látka, a je tak vhodnější pro detekci. Například kokain má biologický poločas přibližně 90 minut. Odbourání 97% drogy v lidském těle trvá okolo sedmi a půl hodiny. Hlavní metabolit kokainu benzoylecgonin má průměrný biologický poločas asi sedm a půl hodiny, a může tak být stanoven v moči po více jak 48 hodinách po požití kokainu. Zadruhé, spektrum zjištěných metabolitů v moči může v mnoha případech pomoci při identifikaci vlastního xenobiotika, tzv. parentní látky. Tato do jisté míry nepřímá identifikace parentních látek využívaná především v oblasti klinické toxikologie má však také svá interpretační úskalí. Kupříkladu heroin má biologický poločas v organismu přibližně tři minuty a poté je metabolizován na 6-monoacetylmorfin, a následně na morfin. Morfin lze v moči zachytit i tři dny po podání heroinu. Kodein, léčivo založené na struktuře opiátů a přítomné v mnoha volně prodejných analgetících, je metabolickými cestami přeměněn také na morfin a na norkodein. Proto přítomnost morfinu ve vzorku tak svědčí nejen o příjmu heroinu, kodeinu, klinicky aplikovaného morfinu nebo nezákonně užívaného morfinu.(6)

2.4 Exkrece

K exkreci xenobiotika z těla dochází hlavně močí, stolicí a vydechovaným vzduchem, v malé míře také potem, slinami, mateřským mlékem a slzami.

Za nejdůležitější exkreční orgán jsou považovány **ledviny**. Při *glomerulární filtraci* jsou xenobiotika vylučována spolu s metabolity endogenního původu a to do velikosti molekulové hmotnosti 60 000 daltonů. V závislosti na svých fyzikálně-chemických vlastnostech mohou být látky resorbovány zpět do krevního řečiště. Pro exkreci je také důležité pH vylučované látky. Bazická xenobiotika, respektive jejich bazické metabolity jsou snadněji exkretovány při nižších hodnotách pH moči, kyseliny naopak při vyšších hodnotách pH moči. Dalším, ale méně významným procesem je *tubulární exkrece pasivní difúzí*. V proximálních tubulech jsou

lokalizovány speciální transportní systémy a některé látky jsou zde z organismu odstraňovány *aktivní tubulární sekrecí*. Mohou zde být transportovány i látky navázané na bílkoviny.

Při postupné filtraci primární moče se utváří důležitý koncentrační gradient mezi krví a močí. Jsou-li látky hydrofilní, mohou se zpět resorbovat v ledvinových tubulech (*tubulární resorpce*) a látka je stále udržována v organismu. Pro zpětnou resorpci látky v ledvinách má význam také pH moči, které určuje množství disociované látky a tím velikost její eliminace.

Eliminace endogenních i exogenních látek **stolicí** se děje dvěma mechanismy. Jedním mechanismem je vazba látek na nestrávené zbytky potravy a druhým je vylučování žlučí. Vlivem bakteriální hydrolyzy konjugátu může dojít ke zpětné resorpci toxické látky a vzniká tak enterohepatální oběh, který prodlužuje biologický poločas xenobiotik. Noxy vykazující enterohepatální oběh jsou nalézány ve střevech i po parenterálním podání (např. opiáty, benzodiazepiny)(7).

Xenobiotika vylučovaná do **žluči** můžeme podle poměru jejich koncentrace ve žluči a plazmě rozdělit do tří skupin:

- látky s poměrem přibližně 1 (např. sodík, draslík, rtuť, glukóza, kobalt)
- látky s poměrem 10 až 100 (např. žlučové kyseliny, bilirubin, olovo, arsen, mangan)
- látky s poměrem menším než 1 (např. inulin, albumin, zlato, chrom, zinek).

Vylučování látek z organismu **plícemi** je důležité především pro některé plyny (CO_2 , HCN, H_2S) a těkavé látky. Eliminace probíhá pravděpodobně prostou difúzí. Rychle jsou exkretovány plyny s nízkou rozpustností v krvi (např. ethylen), pomalu naopak látky s vysokou rozpustností v krvi (např. chloroform).

Důležitá je také exkrece xenobiotik do **mléka**. Týká se látek rozpustných v tucích, které difundují z plazmy do mléčné žlázy a během laktace jsou exkretovány spolu s mlékem. Mohou tak přecházet z těla matky do organismu kojence. Při pH 6,5 obsahuje mléko vyšší koncentrace především xenobiotik zásaditější povahy. Mléko je hlavní exkreční cestou pro DDT a polychlorované bifenyly, pro kovy podobné vápníku (např. olovo) a látky, které mohou vytvářet chelatové komplexy s vápníkem.

Další cestou exkrece může být **pot** (vznik dermatitid) a **sliny**, které jsou obvykle spolknuty a látky v nich obsažené následně vstřebány z gastrointestinálního traktu.

3 Hlavní druhy biologického materiálu

3.1 Krev a její deriváty

Krev je vysoce specializovaná tělesná tekutina, která proudí uzavřeným cévním systémem. Je velmi důležitým transportním a spojovacím médiem, které zajišťuje nepřetržitou výměnu látek mezi buňkami. Další funkcí je udržování stálého prostředí tkáňových i krevních buněk. Přivádí tkáním živiny, kyslík a odvádí oxid uhličitý a odpadní produkty metabolismu. Slouží jako přenašeč hormonů, vitamínů a minerálů a zajišťuje obranné mechanismy organismu.

Krev se skládá z buněčných elementů, které jsou rozptýleny v plasmě. Plasma je tvořena z 92% z vody, ze 7% z bílkovin a zbylé jedno procento připadá na látky anorganické a organické. Z anorganických látek to jsou kationy (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+}), aniony (Cl^- , Br^- , J^-) a plyny (O_2 , CO_2 , N_2). Z organických látek především bílkoviny (albuminy, globuliny, fibrinogen a glykoproteiny), sacharidy, lipidy a látky tvořící se při metabolismu hemoglobinu a bílkovin (bilirubin, močoviny, acetonové látky a laktát). Buněčnou součástí krve tvoří červené krvinky (erytrocyty), bílé krvinky (leukocyty) a krevní destičky (trombocyty).

Schopnost krevních proteinů (např. albuminu) vázat některé látky je fenomén, který je důležitý pro transport látek v krvi a někdy i pro jejich rozpustnost. Ve většině případů je terapeutický efekt léčiva závislý na koncentraci jeho volné frakce. Míra vazby látky na plazmatické proteiny je závislá na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech, na dávce podaného léčiva, na vazebných interakcích různých endogenních či exogenních látek o vazebná místa na proteinu, a dále na funkčnosti vazebné bílkoviny a na aktuálním pH krve. Například terapeutický účinek antiepileptik je zpravidla přímo úměrný koncentraci volného léčiva v séru nebo plazmě. Koncentrace volného antiepileptika závisí na tom, kolik léčiva je momentálně vázáno na sérové proteiny, především na albumin. Snížení vazebné afinity antiepileptik na plazmatické proteiny mění obvyklá dávkovací schémata, protože se mění farmakokinetické parametry léčiva (distribuční objem, rychlost metabolizace a eliminace léčiva) a terapeutický účinek léčiva v organismu. (8)

Rozlišujeme krev nativní a nesrážlivou. Nativní krev neobsahuje antikoagulační přísady a za normálních okolností v ní probíhají srážecí procesy. Naproti tomu nesrážlivá krev obsahuje antikoagulační přísady, které mohou být na

bázi citrátu, EDTA nebo heparinu a jejich solí. Další rozdělení krve může být podle místa odběru. Rozlišujeme tak krev kapilární, žilní nebo arteriální.

Příprava krevního séra: Krevní vzorek se většinou odebírá do plastové zkumavky. Protože se krev v plastové zkumavce často pomalu a nedostatečně sráží, bývají stěny zkumavky opatřeny vrstvou kaolinu či skelnou vatou, což srážení urychlí. Požadovaná doba srážení je minimálně 30 minut. Následně proběhne separace horní vrstvy séra od spodní vrstvy krevního koláče. Separace séra může při malých objemech působit technické potíže. Lze je odstranit použitím speciálního gelového přípravku hydrofobní povahy, který se přidá do zkumavky a po odstředění vytvoří mezi sérem a krevním koláčem pevný polymerní prstenec. Sérum je pak možné bezpečně odpipetovat. Používání těchto tzv. primárních zkumavek přináší značné výhody a v řadě případů snižuje i velikost preanalytických změn. Na druhé straně jejich používání podléhá řadě omezení, která nejsou důsledně uváděna v odborné literatuře a o kterých se výrobci často nezmiňují. Je evidentní, že příčinou řady nepříznivých efektů je různé a neznámé složení gelů ve zkumavkách různých výrobců.(9)

Příprava krevní plazmy: Krev odebíráme do zkumavky s antikoagulační přísadou (heparin sodný, amonný nebo litný, EDTA-sodná nebo draselná sůl, citrát sodný, oxalát sodný nebo draselný, fluorid sodný). Velmi důležité je dodržet předepsaný poměr mezi objemem roztoku antikoagulantia a přidané krve. Krev musíme v nádobce dokonale promíchat, ale nesmíme s ní třepat, mohlo by dojít k mechanické hemolýze. Je také potřeba myslet na to, že antikoagulační přípravek ovlivňuje složení a pH odebrané krve. Po promíchání následuje centrifugace a oddělení světlejší plazmy od krevních buněk. Krevní plazma lépe prezentuje systém „*in vivo*“.

3.2 Synoviální tekutina

Synoviální tekutina je dialyzátem krevní plazmy a produktem buněk synoviální membrány a vyplňuje kloubní dutinu. Její funkcí je především zabezpečení výživy bezcévných kloubních chrupavek, zvyšuje a udržuje jejich pružnost a snižuje tření kloubních ploch.

Složení a množství synoviální tekutiny je poměrně proměnlivé. Například u kolenního kloubu se množství odhaduje zhruba na 2-6 ml za běžných okolností a při patologických stavem může objem stoupat na 10-30 ml. Je pro ni typické velké

množství buněk, až několik tisíc v 1 mm³. Obsahuje 15-25 g/l bílkovin, glukózy 66mg/100ml, kyseliny hyaluronové 2,5-2,7 g/l. Její pH je 7,4-7,7. Vysokou viskozitu synoviální tekutiny způsobuje právě kyselina hyaluronová, která je produkována synovialocyty a je vázána na bílkoviny synoviální tekutiny. S nimi tvoří obrovské molekulární komplexy. Samotná kyselina tvoří trojrozměrné prostorové sítě, které omezují pohyb ostatních látek v roztoku a vytváří film, který odděluje třecí povrchy kloubních chrupavek. Za normálních okolností je synoviální tekutina čirá, při patologických stavech zakalená.

Transport látek přes synoviální membránu závisí na velikosti molekuly. Malé molekuly procházejí snadno v obou směrech. Toho je využíváno při podání léčiv do kloubní dutiny. Velké, např. proteinové molekuly procházejí pouze v případě, že jsou synovialocyty fagocytovány. Je to proces velmi pomalý a pohlcené zbytky jsou ve fagocytujících buňkách přítomny ještě několik měsíců.

Synoviální tekutina se odebírá punkcí a to nejčastěji z kolenního kloubu.

3.3 Tkáně, buňky a subcelulární struktury

Tkáně, buňky nebo subcelulární struktury využíváme při analýze chemického složení, určení enzymových aktivit, pro důkaz a stanovení xenobiotik ve forenzní a biochemické analýze nebo pro „*in vitro*“ experimenty pro biotransformační studie.

Odběr může být proveden jako biopsie (z živého orgánu nebo tkáně), resekce (chirurgický odběr během operace) nebo *post mortem* při pitvě. Při odběru musíme brát v úvahu, že orgán nebo tkáň nebývá homogenní.

Důležitým krokem je proto homogenizace vzorku. Můžeme použít např. Potter-Elvehjemův homogenizátor nebo sonifikace. Homogenát poté suspendujeme do vhodného média (pufru) a jeho další zpracování je jako u tekutých vzorků.

3.4 Moč

Moč je tekutina, která vzniká v ledvinách z protékající krve. Tento vodný roztok obsahuje především odpadní produkty vznikající při látkové výměně (např. konečné produkty metabolismu dusíkatých látek, močovinu, kyselinu močovou, močová barviva, ale i mnoho xenobiotik-léčků, jejich metabolitů či toxinů). Dále v moči nalezneme některé ionty, ale i mnoho dalších látek, které jsou v moči zastoupeny ve stopových množstvích. Velké množství xenobiotik je z těla eliminováno právě močí. Množství a složení moče záleží na mnoha faktorech, jako je např. příjem tekutin,

skladba potravy, celkový stav organismu. Zdravý člověk denně vytvoří kolem 1-2 litrů moče.

pH moči se pohybuje v poměrně širokém rozmezí a je velmi závislé na denní době, na kvalitě stravy, klinickém stavu a na užívaných lécích. Strava bohatá na proteiny způsobuje okyselení moče, naopak dieta obsahující velké množství zeleniny způsobuje alkalizaci moče stejně jako např. antacida.(10) Povaha vylučovaných látek závisí na okamžitém pH. Jak bylo zmíněno v kapitole 2.4., slabě bazické látky jako třeba amfetamin jsou účinněji vylučovány kyselou močí, slabě kyselé látky jsou více vylučovány v alkalické moči.(11)

Pro kvalitativní analýzu jsou preferovány vzorky ranní moče, která je nejkonzentrovanejší. Při sběru moči je třeba zabránit kontaminování vzorku povrchovými bakteriemi (např. důkladné omytí genitálií). Další možností získání vzorku moče je použití katetru. Hrozí ovšem zanesení infekce. Alternativou je odběr moče punkcí, kdy je moč pomocí speciální jehly odebrána přímo z močového měchýře. Pro kvantitativní analýzu se provádí časově vymezený sběr moči (např. 24-hodinový sběr).

Velkou výhodou tohoto materiálu je jeho snadná dostupnost a přitom značná informační hodnota.

3.5 Stolice

K tvorbě stolice dochází v tlustém střevě. Denně přijde do tlustého střeva kolem 1 500 ml tráveniny, většina se vstřebává v jeho první polovině. Vstřebává se především voda, ionty, žlučové kyseliny a vitamin K, který vzniká činností střevní mikroflóry. Nevstřebaný zbytek tráveniny odchází z těla. Denně se vyloučí zhruba 100 až 300 g stolice v závislosti na charakteru stravy.

Stolice obsahuje především nestrávené zbytky potravy, sekrety a odloupanou výstelku GIT, různé bakterie, kvasinky a jiné mikroorganismy a také barviva (sterkobilin).

Pro odběr se používají speciální plastové nádoby s lopatičkou.

Vzorek stolice se používá například pro vyšetření malabsorpce, krvácení do gastrointestinálního traktu nebo pro stanovení finálních produktů biotransformace xenobiotik.

3.6 Žluč

Tvorba žluči probíhá v hepatocytech, z nichž žluč odtéká přes žlučové kanálky do pravého a levého žlučvodu a dále do žlučníku, kde se hromadí a zahušťuje. Žluč je hustá, slabě zásaditá tekutina (pH 7,1-7,3), žlutohnědé barvy, která na vzduchu zelená. Denně se v hepatocytech vytvoří 0,25-1 litr žluči. Žluč je z 97% tvořena vodou, dále pak solemi žlučových a anorganických kyselin, žlučovým barvivem (bilirubin) a lipidy.

Žluč není příliš často používána pro analýzy xenobiotik. Její sběr je poměrně obtížný, obsahuje velké množství látek lipidové povahy a vyšetřovací postupy primárně vyvinuté pro tekutiny o relativně stálém složení u žluči v mnoha případech selhávají. Příkladem je analýza morfinu, který je v případě krve, moči či mozkomíšní tekutiny přímo analyzován RIA metodami. V případě žluči je nejprve nutno provést její alkalizaci, extrakci do směsi dichlormethan:propanol a zbytek rekonstituovat v lidském séru. (12)

3.7 Mozkomíšní tekutina

Mozkomíšní tekutina je čirá kapalina obsahující malé množství bílkovin, cukrů a bílých krvinek. Její celkový objem je 130-150 ml, z toho ¼ objemu se nachází v mozkových komorách a zbytek v subarachnoideálním prostoru. Tekutina se tvoří v cévních pleteních na stropě komor a odtéká otvory ve stropě 4. komory mozkové do subarachnoideálního prostoru, kde dále cirkuluje. Vstřebává se do žilních pletení v *dura mater* a v páteřním kanále. Denně se vytvoří asi 500 ml tekutiny.

Její funkce je především ochranná (nadlehčuje mozek, tlumí nárazy), imunitní a podílí se na odvodu zplodin z mozku.

Mozkomíšní tekutina se běžně získává z bederní oblasti, kde *cauda equina* přechází v míšní kanál. Jehla se zavede do páteřního kanálu mezi třetím a čtvrtým nebo pátým a šestým bederním obratlem a odebere se kolem 3-4 ml tekutiny. Stejný postup se použije i pro získání vzorku mozkomíšní tekutiny od dětí, ale odebere se pouze minimální množství nutné pro požadovaný test. Analýza se může provádět i ze vzorku tekutiny získané z krční oblasti nebo z mozkových komor.

3.8 Sliny

Sliny jsou ultrafiltrátem plasmy. Kromě vody (99%) obsahují sliny také elektrolyty (především sodík, draslík, chloridy a hydrogenuhličitan), proteiny (většinou

enzymy) a mucin. Navíc obsahují i zbytky buněk, potravy a mikroorganismy přítomné v dutině ústní. Přenos látek z krve do slin je ovlivňován bílkovinami vázajícími analyzovanou látku, pK_a , liposolubilitou a pH krve. Pro neionizované látky, jako jsou třeba steroidy (ochotně přechází z plasmy do slin), představuje analýza slin neinvazivní metodu vhodnou pro monitorování. Látky mohou být transportovány z krve do slin přes biologickou membránu pomocí aktivního transportu (např. lithium), usnadněnou difúzí přes póry v membráně (např. ethanol) nebo prostou difúzí po koncentračním gradientu pro látky rozpustné v tucích (např. kodein, kokain).

Pokud dojde k dosažení rovnováhy mezi látkami, které jsou transportovány skrz membrány, závisí koncentrace látky v krvi nebo ve slinách pouze na pH slin v porovnání s krví. (13)

Měření hladin xenobiotik ve slinách bývá využíváno pro odhad volné, farmakologicky aktivní koncentrace látky v séru, protože pouze volná frakce látky může procházet přes membrány. Dalším využitím je detekce ilegálního užití drog. Obvykle jsou drogy ve slinách přítomny v nižších koncentracích a mohou být detekovány v kratším čase ve srovnání s močí.(14)

Existuje několik technik získávání vzorků slin. Jednou z možností je důkladné vypláchnutí úst, po kterém následuje žvýkání inertního materiálu (např. parafinový vosk). První část slin je vyřazena, zbytek je odebrán do malé nádoby. Další možností stimulace může být podání kyseliny citrónové na jazyk nebo aplikace pilokarpinu. (13) V roce 1989 bylo patentováno ultrafiltrační zařízení (SalivaSac), které redukuje viskozitu slin a usnadňuje následnou analýzu. Toto zařízení obsahuje dialyzační membránu, která uzavírá krystalky sacharózy. Měří v průměru 3,5 cm a je silná několik milimetrů. SalivaSac je vložen do úst a několik minut masírován jazykem. Během této doby se nasbírá zhruba 1-2 ml ultrafiltrátu slin.

3.9 Vlasy

Vlasová cibulka se nachází 3 až 4 mm pod povrchem kůže ve vlasovém váčku. V této oblasti se vyskytují aktivně se dělící buňky. Jak jsou vlasové buňky postupně tvořeny, jsou tlačeny směrem nahoru, kde vytváří střední část vlasu. Vlasový váček získává výživu z různých zdrojů, mezi které patří síť kapilár kolem váčku, kožní plexus, mazové a apokrinální žlázy a žlázy potní.

V posledních 50 letech bylo napsáno více než 450 prací o analýze vlasů. Více než polovina nich dokazuje, že lidský vlas je třetím nejdůležitějším biologickým materiálem (po moči a krvi) používaným pro testování drog.(6)

Vlasy, a někdy také nehty, jsou využívány ke analýzám stopových prvků. Vzorky vlasů jsou požívány také pro analýzu obsahu drog. Droga uložená ve vlasech je velmi stabilní a lze ji detekovat i po několika měsících. Protože vlasy rostou relativně konstantní rychlostí (0,3 až 0,4 mm/den), je zde potenciál pro využití segmentové analýzy pro vytvoření jakési „kroniky“ užívání měřené látky(15). Při studiích s methoxymethamfetaminem byla zjištěna nízká korelace mezi podanou dávkou a naměřenou koncentrací látky, nicméně lokalizace látky ve vlasu korelovala s dobou jejího příjmu (16).

Mechanismy, kterými se droga ukládá do vlasů, nejsou zatím přesně známy, ale mohou zahrnovat přenos z krve do rostoucí části vlasu, přenos potem a kožním mazem (některé potní žlázy se vyprazdňují do vlasových folikulů) a kontaminací z okolí (17).

Ani faktory, které ovlivňují uložení látky ve vlasu nejsou dnes ještě podrobně známy. Zahrnují patrně růst vlasů, typ vlasů a jejich barvu (obsah melaninu), efekt používání různých typů vlasových přípravků a nezanedbatelný vliv má zřejmě i znečištění z okolního prostředí.

Úspěšnost analýzy vlasů je limitována chyběním standardních protokolů pro sběr tohoto biologického materiálu, pro přípravu a analýzu analytických vzorků a absencí referenčních limitů. Pro kvantitativní analýzu jsou proto vhodné vzorky moči nebo krve, pokud jsou k dispozici.

3.10 Pot

Sekrece potu je velmi důležitým homeostatickým mechanismem pro udržení konstantní tělesné teploty. Je vylučován na povrch pokožky, kterou během odpařování ochlazuje. Hraje také roli v imunitní obraně organismu. Je tvořen hypertonickým roztokem laktátu, močoviny, amoniovými ionty a enzymy.

Drogy mohou být exkretovány do potu a stejně jako u vlasů spíše ve formě parentní látky než jako metabolity. Vylučování potu může být významným mechanismem, kterým látka vstupuje také do vlasu (18). Způsob, jakým se exogenní a endogenní látky vylučují do potu, ještě není příliš dobře znám. Metody výzkumu

založené na jeho sběru získávají směs potu a kožního mazu, což je při interpretaci výsledku nesprávně považováno za „pot“ (13).

Pro sběr potu existuje několik možností. Malé množství potu je produkováno během elektrické difúze pilokarpinu do kůže nebo zahříváním určité oblasti kůže. Další možností je adhesivní obvaz, který může být nošen od několika dní po několika týdnech, během kterých se látka, je-li přítomna, akumuluje v absorpční vložce náplasti, zatímco vodní páry unikají přes semipermeabilní povrch překrytí (19). Obvazy se aplikují se většinou na horní končetinu, záda nebo bok.

Potní testy (sweat drug testing) nabízejí možnost dlouhodobějšího monitorování užívání drog ve srovnání s analýzami vzorků moči (20).

3.11 Mléko

Mléko není příliš běžnou tekutinou pro analýzy xenobiotik, ale je zajímavým materiálem pro stanovení způsobu přechodu látky z matky na plod. Mnoho autorů považuje za možné adaptovat už existující metody pro analýzy moče nebo séra. Za hlavní problém je považována přítomnost tuků (průměrně 4,5 % v mateřském mléce (21). Jeden z možných postupů pro odstranění tuku z mléka nabídl v práci týkající se analýzy tenoxicamu v mateřském mléce Heinz a spolupracovníci (22). V této proceduře jsou tuky odstraněny promýváním 0,5 ml mléka (pufrovaným na pH 3 až 4) 10 ml *n*-hexanu.

3.12 Mekonium

Mekonium, neboli novorozenecká smolka, je první stolicí novorozence. Tvoří se od 10-12 týdne postupně po vrstvách ze spolykané plodové vody a ze sekretu žluče do střev. Skládá se z vody, mukopolysacharidů, lipidů, proteinů, žlučových kyselin, epitelálních buněk aj. Hodnota pH mekonie je asi 6,8. Tento biologický materiál se využívá se především při zjišťování abuzu drog v průběhu těhotenství. Sběr mekonie probíhá zhruba 1-5 dní po porodu z plenky dítěte.

Hlavním mechanismem transportu drog z krve matky do mekonie plodu je pasivní difúze neionizovaných lipofilních látek. Faktory, které ovlivňují tento proces jsou velikost molekuly, polarita a pK_a hodnota, a dále hodnota pH plazmy a individuální zdravotní stav matky. Například látka s vazbou na plazmatické bílkoviny a ionizovaná v krvi matky poskytuje jen malý podíl k dispozici pro pasivní difúzi do mekonie. (7)

4 Způsoby uchovávání biomatrice

Uložení vzorku s ohledem na sledovaný analyt a typ biomatrice, stejně jako jakákoliv manipulace s ním jsou faktory ovlivňující výsledek stanovení koncentrace i stabilitu tohoto analytu. Obecný postup použitelný univerzálně pro uchovávání různého biologického materiálu neexistuje. Proto je volba nejvhodnějšího způsobu uchovávání biologického vzorku před jeho samotným zpracováním velice důležitá.

Stabilita cílového analytu v biologickém materiálu je rozhodující také pro validaci analytické metody. Nevhodné uchování ovlivňuje obě složky laboratorní nejistoty, tedy systematickou i náhodnou chybu. Míru stability vyjadřuje doba skladovatelnosti roztoků standardů a biomatrice s obsahem analytu. Během této doby nedochází k výrazným změnám v kvalitě a kvantitě stanovované látky. Testy stability analytu se zaměřují především na čtyři typy stability. První je *long-term stability*, kdy se sleduje stabilita analytu v matrici od doby odebrání vzorku, jeho uložení např. při -70°C , až po provedení analýzy. Druhým typem stability je *freeze and thaw stability*, při které sledujeme stabilitu analytu při opakovaných změnách teploty během zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů. Dalším typem je *in-process stability* vztahující se ke stabilitě analytu během přípravy vzorku. A posledním typem je *post-preparative stability*, tedy stabilita analytu např. v autosampleru (23).

Nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími stabilitu analytu v biologickém vzorku jsou především teplota a pH. Míru stability lze ovlivnit vhodnou derivatizací nebo přidáním např. antioxidantů či inhibitorů enzymů. Snížení **teploty** je nejběžnějším způsobem stabilizace sledované látky ve vzorku. Snížení teploty by mělo podstatně snížit nejen enzymatické, ale i spontánní reakce. Pokud je např. aktivační energie 20 kcal/mol , tak snížení teploty z 22°C na 0°C vede k desetkrát pomalejší reakci. Jako příklad ovlivnění stability teplotou bych uvedla cisplatinu, látku používanou při léčbě tumorů a její monohydratovaný komplex. Obě látky jsou rychle degradovány v plasmě při teplotě 25°C , nestabilní jsou i při -25°C , dostatečně stabilní jsou až při -70°C .

Úprava **pH** využívá faktu, že většina enzymů je aktivních pouze v určitém rozmezí pH (pH optimum). Ke vzrůstu pH *ex vivo* v plazmě, žluči a moči dochází během dlouhodobého skladování a během procesů, jako je precipitace proteinů, centrifugace, ultrafiltrace a evaporace. Proto je někdy dodání vhodného pufru nezbytné k zamezení degradace pH labilních analytů. Příkladem takové látky je

acylglukuronid, běžný metabolit léků, které obsahují karboxylovou skupinu jako telmisartan, diclofenac, zomepirac a ibuprofen. Acylglukuronid obsahuje esterovou skupinu, která je náchylná k hydrolyze a intramolekulárním migracím a není stabilní v bazickém prostředí.

Jedním z důvodů **derivatizace** vzorku může být i zvýšení stability analytu v něm obsaženém. Tak např. analyty obsahující sulfhydrylovou skupinu nejsou běžně stabilní v plazmě. Thioly jsou silně nukleofilní a mohou reagovat se zbytky cysteinu v plasmatických proteinech a tvořit disulfidické vazby. Proto takové látky necháváme reagovat s alkylačním činidlem za vzniku Michaelisova adičního produktu. Jako derivatizační činidlo se používá methyl akrylát a *N*-ethylmaleimid.

Další možností posílení stability je přidání **inhibitorů** enzymů do vzorku. Nezbytnou podmínkou pro úspěšnost metody je identifikace enzymu odpovědného za degradaci stanovovaného analytu a vhodnost případného inhibitoru. Jako příklad bych zmínila methylekgonin, který je stanovován v moči, vlasech, slinách, potu a krvi jako specifický marker užívání kokainu. Přidáním fluoridu sodného do vzorku jako inhibitoru esteráz dojde ke snížení degradace methylekgoninu.

Pro snížení degradace analytu vlivem oxidačních pochodů můžeme využít vhodných **antioxidantů**. Příkladem jejich použití je analýza levodopy (L-DOPA), která je používána při léčbě Parkinsonovy nemoci. Tato látka je metabolizována pomocí catechol-*O*-methyltransferázy (COMT) na 3-*O*-methyldopa (3-OMD). L-DOPA a 3-OMD jsou díky své struktuře náchylné k autooxidaci. Přidáním metabisulfitu sodného a EDTA jako antioxidantů do vzorku plazmy lze vzorek uchovávat při -70°C po dobu minimálně 4 měsíců (24).

V následujících odstavcích naleznete několik základních pokynů k uchování biomatrace (krev, moč) pro běžná biochemická a hematologická vyšetření.

Plazma nebo sérum by měly být odděleny od buněk co nejdříve je to možné, nejpozději však 2 hodiny po odběru. Jestliže nelze separaci provést do 2 hodin, je lepší ponechat vzorek při pokojové teplotě než ho zchladit na 4 °C, aby nedošlo k vzestupu hemolýzy. Jsou-li vzorky pro některé speciální analýzy při 4 °C nestabilní, může být sérum zmrazené na -20 °C. Vzorky sér a plazmy mohou být uchovávány při 4 °C po dobu cca 3-5 dní, při -20 °C několik měsíců, při -80 °C několik let. Lyofilizace se používá především pro přípravu kontrolních vzorků. Krev pro stanovení amoniaku musí být během transportu chlazená na 0 °C, podobně kapilární krev pro měření acidobazické rovnováhy musí být uchovávána na ledu a změřena do 1

hodiny. Do vzorků krve pro měření hladiny glykémie a laktátu se přidává fluorid sodný, který na 24 hodin inhibuje glykolýzu. Vzorek určený pro měření koncentrace bilirubinu nesmí být vystavován působení světla, protože bilirubin na světle oxiduje a docházelo by k naměření nižších hladin koncentrace (24). V některých případech je třeba věnovat pozornost také vhodnému výběru antikoagulantů. Například naměřené koncentrace kyseliny valproové v citrátové plazmě bývají nižší až o 20-25% než v séru nebo v heparinované plasmě, zatímco celková koncentrace kyseliny valproové se mezi sérem a heparinovanou plazmou výrazněji neliší (25).

Moč by měla být vyšetřena do 1 hodiny po odběru. Při pokojové teplotě je stabilní zhruba po dobu 24 hodin. Při 4 °C může být uskladněna po dobu 2 týdnů, ale už po 3 až 4 dnech dochází k precipitaci minerálů (soli Ca, Mg, P). Zmraženou na -20 °C až -80 °C můžeme moč uchovávat i několik let. Pro některá speciální vyšetření je potřeba moč acidifikovat nebo alkalizovat. Okyselení se běžně provádí pomocí kyseliny chlorovodíkové (obvykle 1-5 mol/l), alkalizace pomocí 0,3% hydrogenuhličitanu sodného nebo hydroxidem sodným (obvykle 1-5 mol/l). Kontrola pH se provádí po promíchání pomocí pH proužků. Dále můžeme moč upravit pomocí konzervačního prostředku. Ten je běžně přidáván pro redukci činnosti bakterií, pro rozpuštění složek, které mohly z roztoku precipitovat a nebo pro snížení oxidace nestabilních složek. V některých případech ale nelze konzervační látku použít, protože by mohla při některých analytických metodách interferovat. Konzervační prostředky, které jsou obvykle směsí látek jako je fosforečnan draselný, benzoát sodný, kyselina benzoová, hexamethylentetraamin, hydrogenuhličitan sodný, oxid rtuťnatý, jsou používány pro chemická a mikroskopická vyšetření. Protože obsahují sodné a draselné soli, nemohou být použity pro analýzu těchto látek (26).

5 Způsoby zpracování biomatrice

Příprava vzorku biomatrice před samotnou analýzou je nedílnou součástí vlastního stanovení a na jejím provedení záleží úspěch stanovení xenobiotika jak z kvalitativního, tak z kvantitativního hlediska. Analyzované látky jsou většinou přítomny v komplikovaných maticích, jejichž komponenty (např. bílkoviny, ionty, metabolity aj.) mohou interferovat s vlastním stanovením. Volbou vhodné metody přípravy a zpracování biomatrice tedy nerozhodujeme jen o přesnosti a správnosti stanovení analytu, ale vůbec o možnosti jejího určení.

5.1 Uvolnění analytu z matrice

Cílem je uvolnění analytu z biologické matrice, rozštěpení nebo převedení analytu na produkty vhodnější k analytickému stanovení nebo stabilizace analytu, aby nedocházelo k jeho dalším nežádoucím přeměnám.

Během metabolických dějů jsou exogenní látky (stejně tak i endogenní látky) konjugovány s polární látkou, např. kyselinou glukuronovou, aby v polárnější podobě byly snadněji vylučovány z organismu. Rekonstituce analytu z jeho konjugované formy využívá enzymatických nebo hydrolytických metod.

Enzymatická metoda používá např. β -glukuronidasu (E.C. 3.2.1.31) nebo arylsulfatasu (E.C. 3.1.6.1). Enzymatické štěpení můžeme realizovat buď *off-line* (před vlastním stanovením) nebo *on-line* (v průběhu stanovení). Při *off-line* stanovení může přebytek enzymu interferovat s následným chromatografickým či elektromigračním stanovením. Pro *on-line* stanovení se používají kolonky, ve kterých je enzym zakotven. U vysokomolekulárních látek je možnost definovaného štěpení na analyticky lépe zpracovatelné fragmenty. Z výskytu fragmentů můžeme zpětně usuzovat na přítomnost makromolekulární látky. Např. glykosaminoglykany (makromolekulární polysacharidy složené z opakujících se disacharidových jednotek obsahujících buď glukosamin nebo galaktosamin) jsou před vlastním stanovením štěpeny na konstituční disacharidy. K tomuto účelu se používá chondroitinasa ABC (E.C. 4.2.2.4) nebo chondroitinasa AC (E.C. 4.2.2.5) (27).

Mnohem rychleji lze analyt rekonstituovat pomocí metod kyselé nebo alkalické hydrolyzy. Používá se při nich ale extrémních hodnot pH a teploty, proto je vždy třeba zvážit stabilitu analytu.

5.2 Odstranění endogenních látek

Před samotnou analýzou je ve většině případů nutné odstranit interferující makromolekulární složky a homogenizovat analyzovaný vzorek. Z běžnějších metod jsou to nejčastěji denaturace, ultrafiltrace a dialýza.

Denaturace bílkovin se používá například pro přípravu vzorků z plazmy, krve, cerebrospinální tekutiny a lymfy. Oddělení bílkovin srážením je rychlý a jednoduchý postup přispívající k uvolnění analytu z bílkovinné vazby. K denuraci bílkovin se používá roztoků kyselin (tvorba nerozpustných solí s kationickou formou bílkovin, za chladu, 5-20% vodné roztoky kyselin, např. kys. trichloroctová, kys. chloristá), organických rozpouštědel (snížení polarity vodného prostředí a tím snížení rozpustnosti bílkovin ve vodně-organickém prostředí, např. aceton, methanol, ethanol a acetonitril), roztoky anorganických solí (měďnaté nebo zinečnaté soli v alkalickém prostředí, vznikají nerozpustné soli), síranem amonným (malá účinnost, neodstraní víc než 75 % bílkovin) (27).

Ultrafiltrace je jednoduchý způsob oddělení makromolekul. Metoda je založená na schopnosti membrán separovat molekuly na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti. Konicky tvarované membrány se vloží do centrifugačních zkumavek a při nízké centrifugační rychlosti se oddělí makromolekulární komponenty. Výhodou ultrafiltrace je rychlost provedení a malé objemy vzorků.

Při **dialýze** je řídicím jevem prostá difúze komponent přes membránu na základě koncentračního gradientu. Je to děj pomalý a výtěžnost nepřesahuje 50 %, jestliže vzorek a dialyzát mají stejný objem. Modifikací může být elektrodialýza (aplikace napětí na iontově výměnnou membránu způsobuje selektivní pohyb kationů nebo anionů do zony koncentrace na základě aplikovaného proudu) nebo mikrodialýza (použití dialyzačního vlákna).

5.3 Derivatizace xenobiotik

Při derivatizačních reakcích působíme na analyt obsažený ve vzorku derivatizačním činidlem za předem optimalizovaných podmínek. Cílem je změnit jeho chemickou strukturu a převést jej na produkt, který má vlastnosti výhodné pro další instrumentální analýzu. Reakce musí proběhnout kvantitativně.

Volba derivatizačního činidla závisí na chemické povaze analytu, především na přítomnosti vhodných funkčních skupin. V derivatizaci se uplatňuje mnoho

reakčních mechanismů (např. substituční, adičně-eliminační, esterifikační, cyklizační, komplexotvorné, hydrolytické aj.).

Podle způsobu provedení můžeme derivatizace rozdělit na:

- **Předkolonová (precolum der.)** – Chemická reakce probíhá přímo v biomatrici nebo po extrakci analytu do vhodného média. Tvorba derivátu je dokončena před nástřikem na kolonu, na které se během chromatografického procesu separují již deriváty analytu. Reakce musí probíhat za optimalizovaných podmínek a vyžaduje zručnost analytika. Derivatizační reakce musí probíhat s co největším výtěžkem, měla by být selektivní a její rychlost není pro průběh tohoto typu derivatizace hlavním určujícím parametrem. Při použití nadbytku derivatizačního činidla musí být činidlo dobře separovatelné od derivátů. Předkolonovou derivatizací probíhá 90% derivatizačních reakcí.
- **Postkolonová (postcolumn der., online)** – Chemické reakce vedoucí k tvorbě derivátu probíhají za chromatografickou kolonou v eluentu, který kolonu opouští a teprve pak vstupují do detektoru. Derivatizační reakce nemusí probíhat kvantitativně, ale rozhodující je dobrá reprodukovatelnost. Důležitá je také rychlost reakce (musí proběhnout během průchodu reaktorem). Musí být vyzkoušená kompatibilita činidla s mobilní fází. Tento typ derivatizace vyžaduje vyšší náklady na instrumentaci.
- **Heterogenní (on-column der.)** – Dochází při ní ke spojení procesů extrakce na koloně a derivatizace. Tato metoda je zatím málo frekventovaná, ale zdá se být velmi perspektivní.

Ve většině případů vznikají derivatizační reakcí látky méně polární, protože se v průběhu derivatizace modifikují polární funkční skupiny (amino, karboxyl, hydroxyl). Výsledný derivát se proto při použití kapalinové chromatografie téměř vždy dělí v systému s obrácenými fázemi. Vlivem derivatizace dochází ke zvýšení citlivosti nebo selektivity detekce (detection-oriented derivatization), což se uplatňuje u HPLC při analýze látek, které mají slabý vlastní chromofor nebo fluorofor. Dále dochází ke zvýšení lipofility analytů (lipophilicity-increasing derivatization) za účelem zvýšení návratnosti při extrakci analytu z biomatrice. Dalším cílem derivatizace může být zvýšení stability analytu před zpracováním biomatrice před vlastní instrumentální analýzou nebo blokáda jedné nebo obou disociovatelných funkčních skupin amfolytů.

U plynové chromatografie často potřebujeme látku derivatizovat za účelem zamezení nežádoucí sorpce látky na koloně (1).

V tabulce 1 uvádím několik příkladů derivatizace léčiv používaných při HPLC.

Tabulka 1. Příklady derivatizace léčiv (21)

Léčivo	Biomatrice	Derivatizační činidlo	Způsob derivatizace	detektor
Cidofovir	plasma	Phenacyl bromid	předkolonová	fluorescenční
Ethambutol	plasma, moč	4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1 [3-diazol]	předkolonová	fluorescenční
Cisplatina	krev	(salicylaldehyd)tetramethylethylendiimin	předkolonová	UV
Methotrexat	plasma	Cer (IV) trihydroxyhydroperoxid	předkolonová	fluorescenční
Busulfan	plasma	Diethyldithiokarbamat sodný	předkolonová	UV
Simvastatin	plasma	1-bromacetylpyren	-	fluorescenční
Captopril	plasma, moč	Monobromobiman/ o-ftaldialdehyd	Předkolonová /postkolonová	fluorescenční
Digoxin	plasma	1-naftoylchlorid	předkolonová	fluorescenční

5.4 Metody extrakce

Extrakce je separační proces, kdy dochází k rozdělení látek mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. K rozdělení dochází na základě jejich rozdělovacích koeficientů.

5.4.1 Extrakce kapalina – kapalina (LLE, liquid – liquid extraction)(1)

Dochází k extrakci analytu z vodného prostředí (např. homogenát biomatrice) do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Tabulka 2 prezentuje eluotropní řadu nejčastěji používaných rozpouštědel.

Tabulka 2. Eluotropní řada rozpouštědel

Rozpouštědlo	Teplota varu (°C)	Relativní permitivita	Rozpustnost ve vodě (g/l)	Dipólový moment (10^{-30}Cm)
pentan	36,07	1,84	0,04	0
cyklohexan	80,74	2,00	0,10	0
tetrachlormethan	76,50	2,20	0,80	0
benzen	80,10	2,30	1,80	0
Sirouhlík	46,30	2,60	2,20	0
Diethylether	34,50	4,30	74,20	3,84
Chloroform	61,26	4,80	10,00	3,94
Ethylacetát	77,51	6,00	86,00	6,07
Pyridin	115,26	12,40	Mísitelný	7,91
2-propanol	82,26	19,92	Mísitelný	5,54

Aceton	56,50	20,27	Mísitelný	9,44
Methanol	64,70	32,60	Mísitelný	5,63
Acetonitril	81,60	37,50	Mísitelný	11,47
Ethylenglykol	197,30	37,70	Mísitelný	7,61
Voda	100,00	80,36	Mísitelná	-

Jedná se o pH – dependentní extrakce, kdy pH biomatrice upravujeme tak, aby analyt byl v neionizovaném stavu, protože do organické fáze přecházejí pouze molekuly analytu v neionizované formě. Využíváme Hendersonovu – Hasselbachovu rovnici, která udává stupeň ionizace analytu při aktuálním pH vodného prostředí.

Hendersonova – Hasselbachova rovnice pro slabé kyseliny:

$$\text{pH} = \text{pK}_A + \log \left(\frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$$

Hendersonova – Hasselbachova rovnice pro slabé baze:

$$\text{pH} = \text{pK}_V - \text{pK}_B - \log \left(\frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]} \right)$$

pH....záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových iontů

pK_A....záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny

pK_B....záporný dekadický logaritmus disociační konstanty baze

pK_V....záporný dekadický logaritmus iontového produktu vody

[HA], [A⁻]....koncentrace nedisociované a disociované formy kyseliny při daném pH vodného prostředí

[B], [BH⁺]....koncentrace nedisociované a disociované formy baze při daném pH vodného prostředí

Pro kyseliny platí: pH < pK_A potlačení ionizace

pH > pK_A podpoření ionizace

Pro baze platí: pH > pK_A potlačení ionizace

pH < pK_A podpoření ionizace

Tabulka 3. Nedisociované formy analytu (v %)

Analyt	Ion	pK _A + 2	pK _A + 1	pK _A	pK _A - 1	pK _A - 2
Kyseliny	Anion (-)	1	9	50	91	99
Báze	Kation (+)	99	91	50	9	1

U analytů amfolytické povahy biomatrici upravíme na pH izoelektrického bodu, nebo jednu z funkčních skupin derivatizujeme.

Výtěžnost extrakce závisí na rozdělovacím koeficientu (P) extrahovaných látek, ionizovatelnosti analytů a acidobazických poměrech ve vodné fázi.

Rozdělovací koeficient

$$P = c(\text{organická fáze}) / c(\text{vodná fáze})$$

Frakce analytu v organické fázi po první extrakci

$$f(\text{org}) = P \cdot V / (P \cdot V + 1)$$

Frakce analytu ve vodné fázi po první extrakci

$$f(\text{aq}) = 1 / (P \cdot V + 1)$$

Pokud budeme extrakci opakovat n-krát za stejných podmínek, bude sumární výtěžek: $f(\text{total}) = 1 - f(r)^n$

f(r)...frakce analytu, která zůstala v biologickém materiálu

Výhodou této extrakční metody je schopnost extrahovat široké spektrum organických látek a jednoduchost provedení. Další výhodou je také její selektivita, která záleží na volbě vhodného rozpouštědla. Například pokud je xenobiotikum značně metabolizováno a metabolit má stejný chromofor jako původní látka, mohlo by docházet k interferencím se vzorkem. Ale původní látka může být selektivně odstraněna s použitím lipofilního rozpouštědla. Tím se metabolit zanechá v biomatrici. (29)

Nedochází k extrakci metabolitů 2. fáze biotransformace. Nevýhodou může být časová náročnost a velká spotřeba rozpouštědel. V dnešní době je nahrazována tato extrakční metoda některými z modernějších postupů, jako je např. SPE, SPME.

5.4.2 Extrakce na tuhých fázích (SPE, solid phase extraction)(1, 30)

Extrakce na tuhých fázích je velmi používaná technika přípravy vzorku. Pomocí SPE lze předejít některým problémům, které jsou spojené s LLE, jako je např. neúplná separace, nekvantitativní návratnost, práce s křehkým sklem a vysoké množství používaných organických rozpouštědel. SPE je účinnější extrakční technikou než LLE, má vyšší kvantitativní výnosy, je snadno proveditelná a rychlá s možností automatizace.

Kvalita extrakce závisí na výběru vhodné SPE kolonky. Separace může probíhat buď v systému normální fáze (pevná fáze je polárnější než kapalná) nebo v systému reverzní fáze (kapalná fáze je polárnější než pevná). Pro systém normální fáze se jako sorbent nejčastěji používá oktadecyl silikagel nebo oktysilyl silikagel, dále křemelina (oxid křemičitý), alumina (oxid hlinitý), polystyren nebo celuloza aj. Silikagel je tvořen amorfní sítí polymerního oxidu křemičitého. Porézní, sférické částice silikagelu mají na svém povrchu velmi reaktivní silanolové skupiny. Výhodou tohoto materiálu je jeho stabilita, velká reaktivita, velká plocha povrchu, regenerace po změně pH i po zpětné extrakci. Nevýhodou je rozpustnost v zásadité oblasti pH a možnost hydrolyzy vazby u chemicky vázané fáze při nízkém pH. V systému reverzních fází se nejčastěji používá chemicky vázaný fenyl, kyanopropyl, oktyl, oktadecyl aj. Dalším kritériem pro volbu SPE kolonky je typ biologického materiálu, objem vzorku, vlastnosti matrice (zda je polární nebo nepolární) a vlastnosti analytu (obsahuje-li hydrofilní, hydrofobní nebo neutrální skupiny).

Separční mechanismy zahrnují vzájemné interakce mezi molekulami analytů a funkčními skupinami pevné fáze:

- **Nepolární extrakce** – uplatňují se van der Waalsovy síly a disperzní síly. Dochází k interakcím mezi C–H vazbami sorbetu a C–H vazbami analytu. Analyty jsou neutrální molekuly, aromáty, látky s alifatickými řetězci. Matricí je vodná fáze, pufrů a k eluci dochází pomocí rozpouštědel od typicky nepolárních ke středně polárním.
- **Polární extrakce** – při ní se uplatňují vazby vodíkové mezi aktivním vodíkem funkční skupiny analytu a silanolovými skupinami pevné fáze, $\pi - \pi$ a dipól – dipól interakce. Analytem jsou aminy, alkoholy, fenoly, karboxylové kyseliny, aromatické uhlovodíky, heterosloučeniny. Jako matrice je zde nepolární, organická fáze. Eluce se provádí rozpouštědly od středně polárních k vysoce polárním.
- **Ionová výměnná extrakce** – dochází zde k interakcím mezi nabitými skupinami kovalentně vázanými na pevné fázi a ionty v roztoku, které mají opačné znaménko. Pro ionizaci funkčních skupin je velmi důležité pH. Nepolární interference jsou vymyty organickými rozpouštědly, polární interference jsou odstraněny promytím vodou. Tento způsob extrakce se používá pro ionizované/nepolární analyty. Eluce se v tomto případě provádí

pomocí rozpouštědel, která obsahují silnější opačně nabitý ion nebo využijeme změny pH.

- **Kationtově výměnná extrakce** – pevná fáze je tvořena benzensulfonovou kyselinou (silný katex), propylsulfonovou kyselinou (silný katex) nebo karboxylovou kyselinou (slabý anex). Při extrakci se využívá záporně nabitých funkčních skupin kovalentně vázaných na vodné fázi. Analyty jsou např. aminy nebo bazická léčiva. Bazické analyty nesou kladný náboj, k eluci dochází bazickými rozpouštědly (neutralizace analytu). Matricí jsou např. tělní tekutiny.
- **Aniontově výměnná extrakce** – pevná fáze je tvořena kvarterní amoniou solí (silný anex), aminopropylem (slabý anex) nebo diethylaminem (slabý anex), které obsahují kladně nabitě funkční skupiny. Kyselé analyty (fosfáty, karboxylové kyseliny, sulfonové kyseliny) nesou záporný náboj a jsou eluovány kyselými rozpouštědly. Matricí jsou opět např. tělní tekutiny.
- **Interakce na směsných pevných fázích** – pevná fáze (katex, anex) nese záporně nebo kladně nabitě kovalentně vázané funkční skupiny. Analyty (bazické, kyselé, neutrální) nesou náboj opačný. K eluci se používá směs organických rozpouštědel s bazí nebo kyselinou.

Kromě primárních separačních mechanismů, které jsou popsány výše, existuje pro silikagely také možnost výskytu sekundárních interakcí. V případě *reverzních fází* se mohou vyskytovat sekundární polární interakce se zbytkovými silanolovými skupinami. Jestliže nepolární rozpouštědlo nedostatečně eluuje složky z SPE náplně, je nezbytný přídavek polárnějšího rozpouštědla (např. methanol) k rozrušení polárních interakcí, které zadržují složky vzorku. Silanolové skupiny mohou také existovat při $\text{pH} > 4$ jako skupiny Si-O^- . Výsledkem je, že silikagelová kostra může mít i kationtově výměnné sekundární interakce přitahující kationy nebo bazické analyty. V takovém případě je nezbytná úprava pH elučního rozpouštědla (okyselení pro neutralizaci silanolových skupin, alkalizace pro neutralizaci bazických analytů). K tomu může být využito kyselého methanolu (98% MeOH:2% koncentrované HCL) nebo bazického methanolu (98% methanol: 2% koncentrovaného NH_4OH) nebo jejich směsi s více nepolárním rozpouštědlem mísitelným s methanolem. Také v případě *normálních fází* se mohou vyskytovat sekundární nepolární interakce analytu s malým alkylovými řetězci. V tomto případě je pro eluci nezbytný nepolárnější rozpouštědlo nebo směs polárního a nepolárního rozpouštědla.

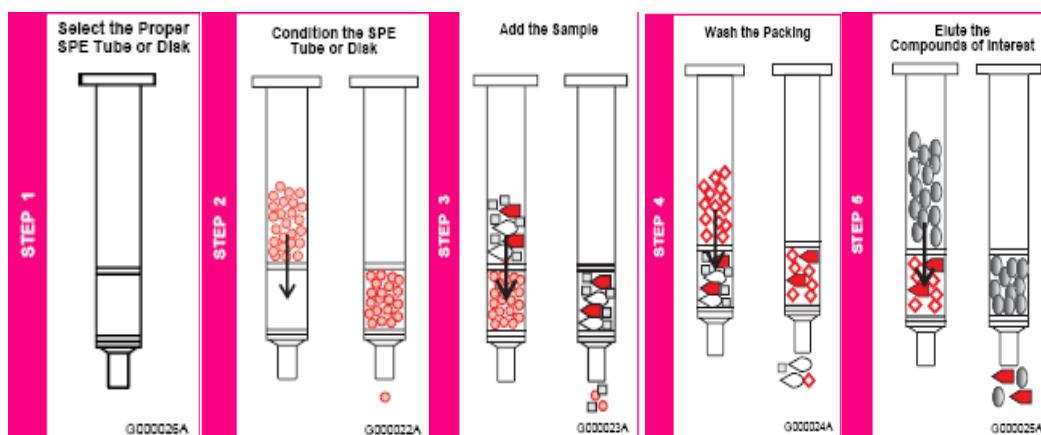
Roztoky používané v SPE procedurách mají velmi široké rozmezí pH. Silikagelové náplně, podobné náplním v HPLC kolonách, jsou většinou stabilní v rozmezí pH 2 až 7,5. Při pH nad a pod touto hranicí mohou být navázané fáze hydrolyzovány a odštěpeny z povrchu silikagelu nebo může dojít k rozpuštění samotného silikagelu. Pokud je stabilita při extrémním pH rozhodující, mohou být použity polymerní materiály nebo materiály založené na bázi grafitovaného uhlíku (carbon-based SPE). Tyto materiály jsou stabilní při rozmezí pH 1-14.

Výhodou SPE je její selektivita, možnost zpracování více vzorků v jedné sérii, jednoduchost provedení, relativní časová nenáročnost a malá spotřeba organických rozpouštědel. Nevýhodou je možná proměnlivost kvality sorbentu při jeho výrobě.

Kroky SPE

- I. **Výběr vhodné kolonky SPE** (viz výše)
- II. **Kondicionace kolonky.** V suchém, neaktivovaném stavu není sorbent připravený k zachytu analytu. Kondicionace vrstvy sorbentu promytím jedním objemem kolonky rozpouštědlem, které má vysokou afinitu k extrahovaným látkám a pufrům o vhodném pH. Sorbent zůstane smočený.
- III. **Aplikace vzorku.** Vnesení tekuté (naředěné) biomatrice a zachycení analytu na povrchu sorbentu. Poté necháme vzorek pomalu procházet skrz extrakční aparát. Použijeme buď vakuum nebo pozitivní tlak. Rychlost průtoku může ovlivnit zadržení jednotlivých součástí.
- IV. **Promytí.** Promytí jedním objemem kolonky stejným roztokem, ve kterém je vzorek rozpuštěn nebo takovým, který nám neodstraní sledovaný analyt. Tím dojde k vymytí zbytků biomatrice. V kolonce zůstává zachycen prakticky pouze analyt.
- V. **Eluce analytu.** Dochází k ní pomocí vybranou směsí organických rozpouštědel vhodnou pro přerušování interakcí analyt – sorbent (při nepolární extrakci methanolem).

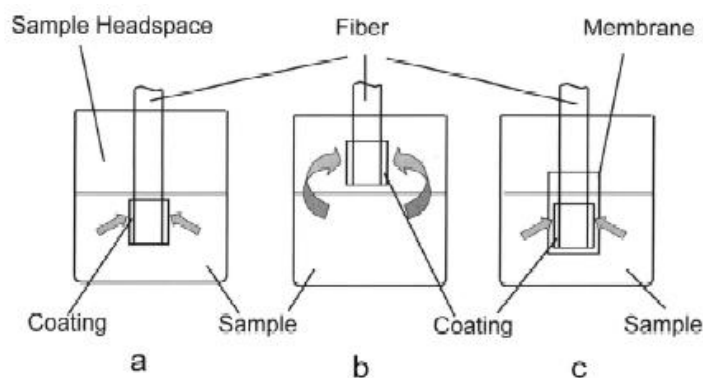
Obrázek 1. Schéma kroků SPE (30)



5.4.3 Mikroextrakce tuhou fází (SPME, Solid phase microextraction)

Mikroextrakce na tuhou fázi je jednoduchá a účinná sorpčně - desorpční technika zakoncentrování analytu, která nevyžaduje rozpouštědla nebo komplikované aparatury. SPME patří k moderním technikám úpravy vzorku, která minimalizuje čas a náklady. Technika byla vyvinuta začátkem 90. let 20. století Januszem Pawliszynem a jeho spolupracovníky (31) na Universitě Waterloo v Kanadě a během několika málo let se rozšířila do mnoha světových laboratoří.

Obrázek 2. Režimy SPME: (a) direct-immersion, (b) head-space, (c) membrane protected SPME (31).



Stacionární fázi tvoří křemenné vlákno pokryté sorpční vrstvou. Vlákno chrání dutá ocelová jehla. Při sorpci analytu je vlákno zataženo dovnitř jehly, která propíchně septum v zátce zkumavky. Posunutím pístu se vlákno vysune do kapalného vzorku (direct-immersion, DI-SPME) nebo do prostoru nad jeho hladinou (Head-space, HS-SPME). Po dosažení sorpční rovnováhy se vlákno opět zasune dovnitř jehly a spolu s ní je vytaženo ze zkumavky se vzorkem a následně se může

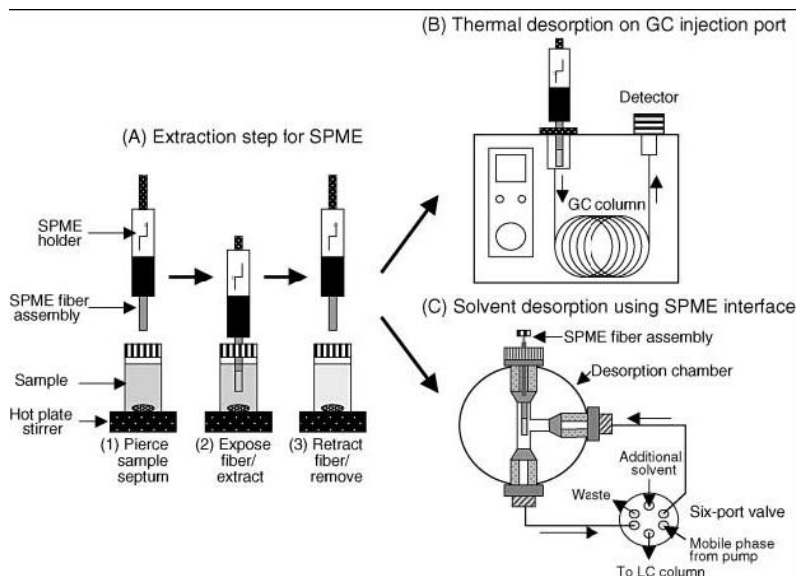
přenést k dávkovači GC, kde jehla propíchně septum dávkovače, dojde k vysunutí vlákna, desorpci analytu a jeho přenosu na kapiláru.

Extrakce většinou trvá kolem 15 až 20 minut, ale časy se mohou výrazně lišit v závislosti na vlastnostech analytu. Pravidelné míchání vzorku extrakci zlepšuje a zrychluje, zvláště u molekul s vyšší molekulovou hmotností a s vyšším difúzním koeficientem. Extrakce při HS-SPME je obecně kratší než při DI-SPME. Extrakční čas záleží také na molekulových hmotnostech extrahovaných analytů a na typu použitého vlákna. Těkavé analyty mohou být extrahovány ponořením do vzorku nebo vzorkováním v prostoru head-space. Netěkavé mohou být extrahovány jenom ponořením vlákna do vzorku. Zvýšení iontové síly roztoku přidavkem soli do vzorků se zvýší účinnost extrakce řady analytů, zvláště látek polárních a těkavých. HS-SPME by měla být aplikována vždy při práci s tělními tekutinami, protože díky bílkovinám přítomným v biologickém materiálu značně roste zatěžování vlákna a klesá jeho životnost. Jako použití HS-SPME bych zmínila analýzy krve, které sice v porovnání s LLE nebo SPE poskytují nižší výtěžek (0,05-10%), ale získaný extrakt je velmi čistý, což zvyšuje detekční limit. Další možností využití HS-SPME jsou analýzy stolice, mateřského mléka, vlasů, vydechnutého vzduchu a slin (32).

Desorpce analytu z vlákna může být tepelná, kdy je jehla zavedena do injektoru plynového chromatografu, zde je látka tepelně desorbována a nesena na GC kolonu. Další možností je desorpce rozpouštědlem. Poté je analyt nesen na kolonu LC nebo HPLC. Čas desorpce by měl být volen co nejkratší. Optimální čas se zjišťuje experimentálně.

Analyt je extrahován ze vzorku pouze do dosažení rovnovážného vztahu. Rovnovážný vztah je závislý na koncentraci analytu ve vzorku, typu a tloušťce polymeru na křemenném vláknu a distribuční konstantě. Distribuční konstanta obecně vzrůstá s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu analytu. Selektivitu extrakčního procesu ovlivníme typem polymeru pokrývajícím vlákno. Platí, že těkavé látky vyžadují silnější vrstvu polymeru. Rovnováhy je dosaženo rychleji v prostoru head-space než při ponoření vlákna, protože analyt může k vláknu difundovat rychleji. Metoda head-space je ideální k potlačení interferencí v analýzách a prodlužuje životnost SPME vlákna.

Obrázek 3. Schéma procesu extrakce a desorpce (31)



Množství analytu adsorbovaného na vlákne při dosažení rovnováhy:

Přímá SPME

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + V_s}$$

Head-space SPME

$$n = \frac{K_{fs} \cdot V_f \cdot c_0 \cdot V_s}{K_{fs} \cdot V_f + K_{hs} \cdot V_h + V_s}$$

nmnožství analytu adsorbovaného na vláknu

c_0počáteční koncentrace analytu ve vzorku

K_{fs}rozdělovací koeficient stacionární fáze-vzorek

K_{hs}rozdělovací koeficient head-space - vzorek

V_fobjem pokrytí

V_sobjem vzorku

Materiály používané k pokrytí křemenného vlákna jsou vybírány s ohledem na co nejvyšší hodnoty K_{fs}/K_{hs} , což způsobuje vysokou sorpční schopnost vlákna se

selektivním efektem. SPME je metodou rovnovážnou, protože hodnota K_{fs} obvykle není dostatečně vysoká, aby se analyt zcela vyextrahoval z matrice.

Materiály pokrývající křemenné vlákno jsou většinou tvořeny jedním nebo dvěma polymery: polydimethylsiloxan (7 μm , 30 μm , 100 μm), polyakrylát (85 μm), Carboxen-polydimethylsiloxan (75 μm), polydimethylsiloxan-divinylbenzen (65 μm) a Carbowax-divinylbenzen (65 μm). Nedávno se již objevily obaly tvořené třemi polymery, např. divinylbenzen-Carboxen-polydimethylsiloxan (33).

V některých případech můžeme použít SPME s ochrannou membránou. Tato selektivně propustná membrána chrání vlákno před nežádoucími účinky způsobenými vysokomolekulárními složkami vzorku. Proces extrakce je značně pomalejší než při DI-SPME, protože analyt musí nejdříve překonat difúzi membránu.

Tabulka 4. Obaly vláken běžně používané při SPME: užití, některé vlastnosti a aplikace (34)

Obalový materiál	Síla vrstvy (μm)	Doporučené použití	Aplikace
polydimethylsiloxan	100, 30, 7	GC, HPLC	nepolární organické složky
polyakrylát	85	GC, HPLC	polární organické složky
polydimethylsiloxan - divinylbenzen	65, 60	GC, HPLC	aromatické uhlovodíky, aromatické aminy
Carboxen-polydimethylsiloxan	75	GC	uhlovodíky
Carbowax-divinylbenzen	65	GC	polární organické složky

Od roku 1993, kdy byla vlákna uvedena na trh, se samozřejmě objevily mnohé výhody i nevýhody úpravy vzorku metodou SPME. Jedním z omezení je nízká schopnost zachytit malé těkavé molekuly. U těchto látek je rovnováhy dosaženo rychle a distribuční konstanta je nízká. Pro zachycení většího množství těchto analytů je důležitá tloušťka a porozita vrstvy.

Při použití SPME metody dochází k výrazné úspoře času, protože operace vzorkování, extrakce, zakoncentrování a dávkování jsou spojeny do jednoho kroku. Aby byla metoda přesná a správná, je potřeba dodržet několik analytických podmínek. Především je potřeba zajistit shodu v délce doby vzorkování, ve velikosti vialek, velikosti a teplotě vzorku a při vzorkování s ponořením dodržovat shodnou hloubku ponoru vlákna do vzorku. Techniku SPME lze tedy používat jak pro

orientační analytická stanovení, tak s vnitřním standardem pro vysoce přesné kvantitativní analýzy.

Nevýhodou SPME v porovnání s LLE nebo SPE je pomalá extrakce a nízký výtěžek. Nevýhodou DI-SPME je také vysoký výskyt interferencí v chromatogramu. Ty jsou způsobeny pouze jednou extrakcí a limitní selektivitou materiálu tvořícího povrch vlákna. Proto dochází snadno k extrakci endogenních látek z plazmy, moči nebo jiných tělních tekutin.

SPME je poměrně nová extrakční technika a postupně vznikají její různé modifikace. Jednou z novějších metod je tzv. *In-tube* SPME, kdy je sorpční fáze nanášena na vnitřní stěnu kapilární kolony. Organické složky ve vodném vzorku jsou extrahovány a koncentrovány ve stacionární fázi během opakovaných cyklů nasávání a vypouštění roztoku vzorku. Velkou výhodou této metody je její rychlost, jednoduchost, eliminace rozpouštědel, velká senzitivita, potřeba malého množství vzorku, nízká cena a velmi snadná automatizace a možnost kombinace s mnoha analytickými metodami, jako je např. HPLC nebo MS (35).

5.4.4 Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Superkritická fluidní extrakce rozděluje látky mezi dvě nemísitelné fáze na základě rozdílných rozdělovacích koeficientů. Extrakčním činidlem je látka v superkritickém stavu. Superkritická tekutina je zvláštní skupenský stav, který spojuje vlastnosti kapalin a plynů. Vznikne zahřátím kapaliny/plynu na teplotu vyšší, než je její/jeho kritická teplota T_k při současném stlačení na hodnotu vyšší než je její/jeho kritický tlak p_k . Její fyzikální vlastnosti tvoří přechod mezi vlastnostmi kapaliny a plynu. Je stlačitelná, lze měnit její hustotu a tím její rozpouštěcí vlastnosti. Viskozita je nižší než u kapalin, dosahuje se rychlého převodu hmoty v důsledku příznivých charakteristik toku. Difúzní konstanta je blízká plynům. Má nízké povrchové napětí, což má za následek snadné pronikání superkritické tekutiny do pórů pevné fáze.

Pro SFE se nejčastěji používá CO_2 v superkritickém stavu (teplota $> 31^\circ\text{C}$, tlak $> 7,3 \text{ MPa}$). Je to látka nehořlavá, nevýbušná, netoxická, levná a snadno dostupná, ekologicky nezávadná. Technika je vhodná především pro extrakci málo polárních látek (silice, oleje, vosky, karotenoidy). Pro extrakci polárnějších látek je potřeba modifikátory (např. methanol, acetonitril, voda, tetrahydrofuran aj.)(36).

Tabulka 5. Vybrané fyzikální vlastnosti plynu, superkritické tekutiny a kapaliny

	Hustota (g.ml ⁻¹)	Viskozita (Pa.s)	Difuzivita (cm ² .s ⁻¹)
Plyn	ca 10 ⁻³	0,5 – 3,5 . 10 ⁻⁵	0,01 – 1,0
SCF	0,2 – 0,9	0,2 – 1,0 . 10 ⁻⁴	3,3 – 0,1 . 10 ⁻⁴
Kapalina	0,8 – 1,0	0,3 – 2,4 . 10 ⁻³	0,5 – 2,0 . 10 ⁻⁵

Celé uspořádání je relativně náročné na technické provedení , vlastní extrakce probíhá v „pouzdrě“ (cartrige) vybaveném restriktorem. V některých aplikacích může být v pouzdrě také sorbent.

SFE je poměrně oblíbená extrakční metoda využívaná hlavně pro pevné materiály, jako je např. rozmělněný rostlinný materiál, některé potraviny nebo polymery. Obtížnější jsou analýzy kapalin, například tělních tekutin, které vyžadují imobilizaci na pevný materiál (37).

5.5 Molecularly Imprinted Polymers (MIPs)

Technika molekulárního imprintingu je účinný technologický postup pro vytvoření specifických rozpoznávacích míst pro určitý analyt v hustě síťovaných polymerních maticích. Tyto polymery jsou určeny pro vysoce selektivní extrakce jedné sloučeniny nebo skupiny strukturně podobných sloučenin. S výhodou jsou používány pro složité matrice a pro látky s molekulou menší než 5 kilodaltonů. Další výhodou jsou nízké detekční limity a použitelnost při širokém rozmezí pH (1-14) a teploty. MIPs nachází široké využití např. při SPE nebo jako náplň HPLC kolon.

Specifita metody je zajištěna během výroby polymeru. Pracovní postup při molekulárním imprintingu zahrnuje smíchání chemikálií v příslušných poměrech, jejich rozpuštění v acetonitrilu, či v jiném organickém rozpouštědle, odplynění pomocí probublávání dusíkem po dobu 5-10 minut, poté se nádobka uzavře a zahřeje na 60-70 °C na dobu 12-14 hodin. Vytvořený polymer se rozemele v hmoždíři a nechá prosít. Částice mají obvyklou požadovanou velikost 80-160 µm. Polymer se nakonec dávkuje do SPE kartridže. Poté se imprintované molekuly, nezreagované monomery, iniciátory polymerace vymývají acetonitrem, směsí acetonitrilu a chloroformu, methanolem či ethanolem do vymizení signálu molekul na detektoru. Proces vymývání trvá okolo 16 hodin. Polymer tak vytvoří funkční matici s rozpoznávacími místy komplementárními vůči analytu strukturně totožnému nebo velmi blízkému imprintovaným molekulám. Molekuly se váží s monomery různými typy interakcí

založenými na bázi kovalentních vazeb (v případě cukrů, aminokyselin, ketonů, aldehydů, transferinu), elektrostatických silách, hydrofobních interakcích nebo vodíkových můstcích (barviva, diaminy, vitaminy, deriváty aminokyselin, peptidy, beta blokátory, theofilin, diazepam, nukleotidové báze, naproxen (38-40).

Při imprintingu jde především o kopolymerizaci monomerů metakrylové kyseliny, akrylové kyseliny, vinylbenzoové kyseliny, ethylstyrenu, vinylimidazolu a dalších funkčních monomerů s ethylenglykoldimethakrylátovými monomery (= prostředek pro zesíťování) v přítomnosti imprintované molekuly analytu (nazývané též templátová molekula, receptorová molekula nebo guest molekul). Iniciátorem radikálů důležitých pro vznik sítě je alfa,alfa'-azoisobutyronitril (39).

MIPs jsou v posledních letech využívány také pro chirální separace. Pokud je opticky aktivní složka úspěšně imprintována, vzniklý polymer je schopný rozlišovat mezi imprintovanou molekulou a jejím antipodem. Může proto být využíván jako chirální stacionární fáze.

Zajímavým rozšířením metody MIPs je tzv. povrchový imprinting, kdy se využívá makromolekul jako např. bílkovin.

Další z mnoha oblastí využití MIPs, která byla testována, je jejich schopnost napodobit protilátku. Např. *anti-theophylline MIPs* byl používán ke stanovení koncentrace theofilinu v séru pacienta s cílem využití MIPs jako alternativy ke klasickým imunoesejím. (39)

6 Závěr

V bakalářské práci jsem se zabývala několika podstatnými fázemi, které předchází samotnou analýzu sledovaného xenobiotika.

V kapitole o osudu xenobiotika v organismu jsem se věnovala jeho jednotlivým fázím ADME (absorpce, distribuce, metabolismus a exkrece) s ohledem na to, v jakých částech organismu k jednotlivým fázím dochází a jaké fyziologické mechanismy při nich hrají roli.

V následující kapitole jsem se zaměřila na hlavní druhy biologického materiálu a na způsoby jeho odběru. Zmínila jsem i nepříliš běžné materiály, jako jsou například vlasy, sliny, pot, mateřské mléko nebo mekonium.

V kapitole o uchovávání biomatrice jsem se zabývala především ovlivněním stability sledovaného analytu při změnách podmínek skladování. Poslední odstavce kapitoly jsem věnovala základním pokynům pro uchovávání krve a moči pro běžná biochemická a hematologická vyšetření.

Nejobsáhlejší část práce je věnována jednotlivým způsobům zpracování biologického materiálu. Zaměřila jsem se především na vybrané metody extrakční a techniku molekulárního imprintingu. U každé metody jsem se pokusila uvést její výhody a nevýhody, případně pro jaké typy biomatrice, analytu nebo analytické metody se vybraný typ zpracování hodí.

7 Literatura

1. NOBILIS, M. Studijní materiály, Ústav experimentální biofarmacie, spol. prac. AV ČR a PRO. MED. SC Praha a.s., Hradec Králové 2007-2008.
2. ŠTAUD, F. studijní materiály, Katedra farmakologie a toxikologie Faf UK v HK, 2007-2008.
3. KOZLOWSKA, K. et. al Analytical procedures used in examining human urine samples. *Polish Journal of Enviromental Studies*, 2003, 12, s. 503-521.
4. KNEJZLÍK, Z., KÁŠ, J., RUML, T. Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chemické listy*, 2000, 94, s. 913-918.
5. TURCONI, G., GUARCELLO, M., LIVIERI, C. et al. Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn – an epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy). *Eur. J. Nutr.*, 2004, 43, s. 191-197.
6. ROUEN, D., DOLAN, K., KIMBER, J. A Review of Drug Detection Testing and an Examination of Urine, Hair, Saliva and Sweat. *NDARC Technical Report No. 120*, 2001, s. 1-53.
7. BALÍKOVÁ, M. Alternativní materiály v toxikologii. Ústav soudního lékařství a toxikologie. Dostupný na WWW: <http://soudni.lf1.cuni.cz>.
8. GRAIGNER-ROUSSEAU, T. J., Mc ELNAY, J.C., COLLIER, P.S. The influence of disease on plasma protein binding of drugs. *Int. J. Pharm.*, 1989, 54, s. 1-13.
9. FRIEDECKÝ, B, KRATOCHVÍLA, J., HORÁK, J. et. al. Preamalytická fáze. Pardubice: SEKK s.r.o., 1997, s. 1-45.
10. COOK, J.D., STRAUSS, K.A., CAPLAN, Y.H. et al. Urine pH: The effect of time and temperature after collection. *J. Anal. Toxicol.*, 2007, vol. 31, s. 486-496.
11. BECKETT, A. H. Distribution and metabolism in man of some narcotic analgesics and some amphetamines. In STEINBERG, H. Scientific basis of drug dependence. London: Churchill, 1969, s. 129.
12. KROL, G. J., NOE, A. J., YEH, S. C. Gas and liquid chromatographic analysis of nimodipine calcium antagonist in blood plasma and cerebrospinal fluid. *J. Chromatogr.*, 1984, 305, s.105-118.
13. KIDWELL, D.A., HOLLAND, J.C., ATHANASELIS, S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J. Chromatogr. B*, 1998, 713, s.111-135.
14. SCHRAMM, W., CRAIG, P.A., SMITH, R.H., BERGER, G.E. Cocaine and benzoylecgonine in saliva, serum and urine, *Clin. Chem.*,1993, 39, s. 481-487.

15. PORTER, W.H., Clinical Toxicology. In: BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. St. Louis, USA: Elsevier Saunders, 2006, s. 1287-1369.
16. NAKAHARA, Y., SHIMAMINE, M., TAKAHASHI, K. Hair analysis for drugs of abuse. III. Movement and stability of methoxyphenamine (as a model compound of methamphetamine). *J. Anal. Toxicol.*, 1992, 16, s. 253-257.
17. JOSEPH, R.E., HÖLD, K.M., WILKINS, D.G. et al. Drug testing with alternative matrices II. Mechanisms of cocaine and codeine deposition in hair. *J. Anal. Toxicol.*, 1999, 23, s. 396-408.
18. CONE, E.J., HILLSGROVE, M.J., JENKINS, A.J. et al. Sweat testing for heroin, cocaine, and metabolites. *J. Anal. Toxicol.*, 1994, 18, s.298-305.
19. KINTZ, P., TRACQUI, A., JAMEY, C., MANGIN, P. Detection of codeine and phenobarbital in sweat collected with a sweat patch. *J. Anal. Toxicol.*, 1996, 20, s. 197-201.
20. BURNS, M., BASELT, R.C. Monitoring drug use with a sweat patch: an experiment with cocaine. *J. Anal. Toxicol.*, 1995, 19, s. 41-48.
21. CHAMBERLAIN, J. The analysis of drug in biological fluids. Second edition. Florida: CRC Press, 1995. 45 s.
22. HEINZ, R.C, STEBLER, T., LUNELL, N. O., et al. Excretion of tenoxicam and 5'-hydroxy-tenoxicam into human milk. *J. Pharmacol. Med.*, 1993, 3, s. 57.
23. PETERS, F.T. Stability of analytes in biosamples-an important issue in clinical and forensic toxicology? *Anal. Bioanal.Chem.*, 2007, 388, s.1505-1519.
24. CHEN, J., HSIEH, Y. Stabilizing drug molecules in biological samples. *Ther Drug Monit*, 2005, 27, s. 617-624.
24. RACEK, J. et al. Klinická biochemie. Druhé, přepracované vydání. Praha: Galén, 2006, 329 s.
25. PENG, G.W., CHIOU, W.L. Analysis of drugs and other toxic substances in biological samples for pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr.*, 1990, 531, s. 3-50.
26. ZOUNY, D.S., BERMES, E.W., HAVERSTICK, D.M., Specimen collection and processing. In: BURTIS, C.A., ASHWOOD, E.R., BRUNS, D.E. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. St. Louis, USA: Elsevier Saunders, 2006, s. 41-58.

27. DEYL, Z., UHROVÁ, M. Chromatografické a elektromigrační metody pro analýzu biologických vzorků: Derivatizační reakce pro biologické materiály. s. 15-28. Studijní materiály, UPa.
28. MAREŠOVÁ, V. Principy řízených extrakcí tox z biologického materiálu pro různé typy toxikologických analýz. Ústav soudního lékařství a toxikologie. Dostupný na WWW: <http://soudni.lf1.cuni.cz>.
29. McDOWALL, R.D. Sample preparation for biomedical analysis, *J. Chromatogr.*, 1989, 492, s. 3-58.
30. Guide to Solid Phase Extraction. Bulletin 910, Sigma-Aldrich Co., 1998, 12 s.
31. LORD, H., PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A*, 2000, 885, s.153-193.
32. MILLS, G.A., WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr. A*, 2000, 902, s. 267-287.
33. ULRICH, S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis, *J. Chromatogr. A*, 2000, 902, s.167-194.
34. de FATIMA ALPENDURADA, M. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr. A*, 2000, 889, s. 3-14.
35. KATAOKA, H. Automated sample preparation using in-tube solid-phase microextraction and its application. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, 373, s. 31-45.
36. FIELD, J.A. Coupling chemical derivatization reactions with supercritical fluid extraction. *J. Chromatogr. A*, 1997, 785, s. 239-249.
37. SMITH, R.M. Before the injection-modern methods of sample preparation for preparation techniques. *J. Chromatogr. A*, 2003, 1000, s. 3-27.
38. SUAREZ-RODRIGUEZ, J.L., DIAZ-GARCIA, M.E. Flavonol fluorescent flow-through sensing based on a molecular imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 405, s. 67-76.
39. KEMPE, M., MOSBACH, K. Molecular imprinting used for chiral separations. *J. Chromatogr. A*, 1995, 694, s. 3-13.
40. STEVENSON, D. Molecular imprinted polymers for solid-phase extraction. *Trends Anal. Chem.*, 1999, 18, s. 154-158.