

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



**MODERNÍ TRENDY V ÚPRAVĚ VZORKŮ
BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU K ANALÝZE
VYBRANÝCH BIOLOGICKY AKTIVNÍCH
LÁTEK**

Disertační práce

2012

Mgr. Petr Sadílek

Poděkování

Na tomto místě bych chtěl poděkovat svému školiteli Prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za jeho odbornou pomoc, podnětné návrhy a připomínky, ale také inspiraci a motivaci během mého postgraduálního studia. Doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D. děkuji za odborné vedení, vydatnou pomoc a cenné rady během celého studia.

Rád bych také poděkoval všem členům katedry i pracovníkům Hematologické laboratoře II. interní kliniky Oddělení klinické hematologie FN Hradec Králové za vstřícnost, trpělivost, příjemné pracovní prostředí a pomoc při sepisování této disertační práce.

Děkuji také své rodině, přítelkyni a přátelům za velkou podporu během celého postgraduálního studia.

Také bych rád poděkoval všem grantovým agenturám za finanční podporu mých výzkumných úkolů a za možnost prezentovat naměřené výsledky na domácích i zahraničních vědeckých konferencích. Jedná se zejména o projekty: SVV/2012/265 002, IGA MZ ČR 1A/8689-4, IGA MZ ČR NR/9103-4/2006 a Výzkumný záměr MSM 0021620822.

Petr Sadílek

Prohlašuji, že tato práce je mým autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.

Petr Sadílek

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Petr Sadílek

Školitel: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel specialista: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Název disertační práce: Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek

Disertační práce se zabývá stanovením vybraných léčiv, jejich metabolitů a dalších biologicky aktivních látek v biologickém materiálu. Tato oblast instrumentální analýzy se dostává v posledních letech do popředí zájmu, zejména z důvodu monitorování a optimalizace léčby s cílem dosáhnout individuálně co nejefektivnější terapie s minimem nežádoucích vedlejších účinků, či z důvodů toxikologických.

Práce se soustředila na celou analytickou fázi laboratorního vyšetření, tzn. nejen na vývoj a validaci chromatografických metod pro stanovení cílových analytů, ale zejména na přípravu vzorku biologického materiálu před vlastní analýzou. Tato fáze je pro samotné stanovení analytů z biologického materiálu naprosto nezbytná, neboť určuje nejen správnost výsledku laboratorního vyšetření, ale také životnost analytické instrumentace, zvláště chromatografických kolon. V současné době se stále nejvíce používají k přípravě vzorku k analýze tradiční extrakční techniky LLE a SPE, které jsou však velice pracné, obtížně automatizovatelné, časově náročné, s vysokou spotřebou vzorku a organických rozpouštědel. Proto se v současné době vyvíjí mnoho nových technik přípravy vzorku k analýze, které eliminují výše uvedené nedostatky.

Teoretická část této disertační práce se v úvodu zabývá různými pre-analytickými vlivy, které mohou významně ovlivnit výsledek analýzy. Vliv pre-analytické fáze na výsledek laboratorního vyšetření je často opomíjen, přestože se jedná o oblast, kde může vzniknout obrovské množství chyb, které mohou výsledek ovlivnit zcela zásadně.

Dále se teoretická část věnuje technikám přípravy vzorku k analýze, na jejichž provedení je správnost výsledku opět výrazně závislá. Jsou zde popsány nejčastěji

používané tradiční techniky přípravy vzorku, hlavní pozornost je však věnována moderním extrakčním technikám, které se rozvíjejí v posledních letech a které vedou k plné automatizaci, miniaturizaci a urychlení přípravy vzorku před analýzou.

Důležitou součástí této disertační práce je vypracovaná rešeršní publikace týkající se využití moderních extrakčních sorbentů, tzv. materiálů s omezeným přístupem (RAM), umožňujících on-line extrakci přímo v chromatografickém zařízení a techniky přepínání kolon v HPLC analýze biologicky aktivních látek v komplexních matricích.

Experimentální část disertační práce je rozdělena do dvou tematických celků. První se věnuje problematice stanovení vitamínu A a vitamínu E v biologickém materiálu. Byla vyvinuta a validována HPLC metoda s UV detekcí a s on-line extrakcí probíhající přímo v chromatografickém systému na speciálních extrakčních sorbentech, tzv. RAM, zapojených do systému technikou přepínání kolon (CSW) pro současné stanovení vitamínu A a vitamínu E v plazmě a v séru.

Druhý okruh experimentální části se zabývá problematikou chromatografického stanovení statinů a jejich metabolitů v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích. Zde byly publikovány dva články. První recenzovaný se týká počátků vývoje chromatografických metod pro stanovení statinů na našem pracovišti, druhý impaktovaný se zabývá vývojem a validací UPLC-MS/MS metody pro současné stanovení simvastatinu, atorvastatinu, jejich metabolitů a laktonových forem v biologickém materiálu po předchozí SPE.

Všechny vyvinuté metody jsou detailně popsány v publikovaných pracích. Jejich plná znění jsou uvedena v přílohách a jsou doplněna krátkým komentářem v kapitole „Výsledky a diskuze“.

ABSTRACT

Charles University in Prague Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Petr Sadílek, M.Sc.

Supervisor: Prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Co-supervisor: Doc. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Title of Doctoral Thesis: Modern Trends in Sample Preparation of Biological Material for Analysis of Selected Biologically Active Compounds

This doctoral thesis deals with the determination of selected drugs, their metabolites and other biologically active substances in biological materials. This area of instrumental analysis turns out to be very attractive recently. The reason for this is the need to monitor and optimise treatment and the goal is to achieve the most effective therapy with minimum side effects of drugs for every individual; there are also toxicological reasons.

The thesis concentrates on the entire analytical phase of laboratory screening, i.e. not just on development and validation of chromatographical methods of analysis, but also (and especially) on preparation of biological samples prior to the actual analysis. This phase is crucial for analytes assessment, since it determines not only correct results of the laboratory examination, but also influences the lifespan of laboratory equipment, especially chromatographic columns. These days mostly traditional Liquid-Liquid Extraction (LLE) and Solid-Phase Extraction (SPE) methods are used during samples preparation. These are very work-intensive, time-consuming and difficult to automate. They also have high consumption of organical solvents as well as the actual sample material. To eliminate the above mentioned drawbacks many new sample preparation methods are being developed recently.

The introduction of the theoretical part of this thesis deals with various pre-analytical influences, which can significantly impact the result of the analysis. There is often lack of attention paid to pre-analytical phase of laboratory examination, despite the fact that this is the point, where enormous amount of errors can occur. These errors can have harsh influence on the outcome of the analysis.

Further on the theoretical part focuses on sample preparation techniques – their execution can again influence the correct result significantly. Traditional methods are described, however most attention is paid to modern extraction techniques. These are developing rapidly in the past few years and lead to full automation, miniaturization and minimalization of pre-analysis lead time.

Important part of this doctoral thesis is a published article related to the use of modern extraction sorbents, so-called Restricted-Access Materials (RAM), which allow on-line extraction directly in the chromatographic equipment and also column-switching technique in high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of biologically active substances in complex matrices.

Experimental part of this doctoral thesis is divided into two parts. First deals with matters of vitamin A and vitamin E detection in biological material. HPLC method with UV detection and on-line extraction has been developed and validated. The extraction takes place directly in the chromatographical system on special RAM extraction sorbents, which are included in the system using column-switching technique (CSW). This allows vitamin A and vitamin E to be determined simultaneously in both plasma and serum.

Second topic of the experimental part deals with the matters of chromatographic determination of statins and their metabolites in serum and in particular lipoprotein fractions. Two articles have been published on this topic. First one describes the beginning of development of chromatographic methods for the determination of statins in our laboratory. Second one deals with the development and validation of Ultra-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method (UPLC-MS/MS) for simultaneous determination of simvastatin, atorvastatin, their metabolites and lacton forms in biological material after prior SPE.

All developed methods are described thoroughly in previously published articles. Their full wording is included under appendices and short commentary can be found in the chapter „Results and Discussion“.

SEZNAM ZKRATEK

ACD	kyselý citrát s dextrózou
ACN	acetonitril
ACP	kyselá fosfatáza
ADS	alkyl-diol-silika
AFP	α 1-fetoprotein
AGP	α -glykoprotein
ALP	alkalická fosfatáza
ALT	alaninaminotransferáza
AST	aspartátaminotransferáza
BIN	barrel insert and needle assembly
C18	oktadecyl
C2	ethyl
C4	butyl
C8	oktyl
CE	kapilární elektroforéza
CFME	mikroextrakce v kontinuálním toku
CIAME	cold-induced aggregation microextraction
CSP	chirální stacionární fáze
CSW	technika přepínání kolon
DI-	direct-immersion
DLLME	mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
FIA	průtoková injekční analýza
FN	fakultní nemocnice
GC	plynová chromatografie
GFF	tripeptid glycin-fenylalanin-fenylalanin
HCG	lidský choriový gonadotropin
HDL	vysokodenzitní lipoprotein
HF-LPME	mikroextrakce využívající duté vlákno
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HS-	headspace
IAE	imunoafinitní extrakce
IDL	lipoprotein o střední denzitě
IF	impakt faktor
IL	ionic liquid
ISRP	materiály s vnitřním hydrofóbním povrchem
ISs	imunosorbenty
IT-SPME	mikroextrakce v kapilárních kolonách
K ₃ EDTA	draselná sůl ethylendiamintetraoctové kyseliny
LC	kapalinová chromatografie
LD	laktátdehydrogenáza
LDL	nízkodenzitní lipoprotein
LLE	extrakce kapalnou fází
LLLME	liquid-liquid-liquid microextraction
LLME	mikroextrakce kapalnou fází
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LPS	materiály s velkými částicemi
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
MA-DVB	metakrylát-divinylbenzen
MEPS	mikroextrakce tuhou fází
MIPs	molekulárně vtištěné polymery
MS	hmotnostní spektrometrie
PDMS	polydimethylsiloxan
PMA	polymetakrylát
PMME	polymer monolith microextraction
PS-DVB	polystyren-divinylbenzen
RAM	materiály s omezeným přístupem
RCF	relativní centrifugační síla
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní fáze
SALLE	extrakce vysolováním
SBSE	sorpční extrakce na míchadle
SDME	mikroextrakce jednou kapkou

SDS	dodecylsulfát sodný
SFO	solidification of floating organic drop
SHP	stíněné hydrofóbní fáze
SIA	sekvenční injekční analýza
SLM	supported liquid membrane
SLP	správná laboratorní praxe
SP1-beta	beta1-těhotenský specifický glykoprotein
SPDE	dynamická extrakce na pevnou fázi
SPE	extrakce na pevnou fázi
SPME	mikroextrakce na pevnou fázi
SPS	semipermeabilní povrchy
TAT	celkový čas analýzy
TFC	chromatografie s vířivým tokem
UV	ultrafialová spektrofotometrie
UPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
VLDL	velmi nízkodenzitní lipoprotein
XDS	exchange-diol-silica

OBSAH

ÚVOD	13
CÍL PRÁCE	15
TEORETICKÁ ČÁST	16
1. Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření	16
1.1. Osoba pacienta	17
1.1.1. Faktory neovlivnitelné	18
1.1.1.1. Pohlaví	18
1.1.1.2. Rasa, etnická či sociální skupina obyvatel	19
1.1.1.3. Věk	19
1.1.1.4. Biologické cykly	20
1.1.1.5. Gravidita	21
1.1.1.6. Současně probíhající jiná nemoc	21
1.1.1.7. Biologický poločas stanovované látky	22
1.1.1.8. Způsob stanovení referenčních hodnot	22
1.1.2. Faktory ovlivnitelné	23
1.1.2.1. Hmotnost organismu	23
1.1.2.2. Fyzická aktivita	23
1.1.2.3. Psychický stres	24
1.1.2.4. Vliv potravy, alkoholu a tekutin	24
1.1.2.5. Kouření	25
1.1.2.6. Léky a drogy	25
1.1.2.7. Operace	27
1.1.2.8. Zevní prostředí	27
1.1.2.9. Mechanické vlivy	27
1.2. Odběr vzorku biologického materiálu	27
1.2.1. Odběr krve	28
1.2.1.1. Odběr venózní krve	28
1.2.1.2. Odběr kapilární krve	37
1.2.1.3. Odběr arteriální krve	39
1.2.2. Odběr moči	40
1.2.3. Odběr stolice	40
1.2.4. Odběr sputa	41
1.2.5. Výtěry a stěry	41
1.2.6. Odběr žaludečního obsahu, zvratků a výplach žaludku	42
1.2.7. Punkce	42
1.2.8. Biopsie	43
1.2.9. Odběry ostatních biologických materiálů	44
1.3. Transport vzorků do laboratoře	44
1.4. Uchovávání vzorků před analýzou	45
1.5. Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze	46
2. Techniky přípravy vzorku biologického materiálu k analýze	46
2.1. Homogenizace	48
2.2. Deproteinace	49
2.2.1. Ultrafiltrace	49
2.2.2. Dialýza	51
2.2.3. Precipitační techniky	53
2.3. Centrifugace, ultracentrifugace	54
2.3.1. Diferenciální centrifugace	56
2.3.2. Gradientová centrifugace	57
2.4. Přímý nástřik	59
2.5. Derivatizace	60

2.6. Extrakce	61
2.6.1. Přístupy založené na liquid-liquid extrakci (LLE).....	61
2.6.1.1. Extrakce kapalnou fází (LLE).....	61
2.6.1.2. Mikroextrakce kapalnou fází (LLME)	63
2.6.1.3. Extrakce vysolováním (SALLE).....	71
2.6.2. Přístupy založené na solid-phase extrakci (SPE).....	72
2.6.2.1. Extrakce na pevnou fází (SPE)	72
2.6.2.2. Mikroextrakce na pevnou fází (SPME).....	75
2.6.2.3. Mikroextrakce na sorbentu v pipetovací špičce	80
2.6.2.4. Mikroextrakce na čípech	81
2.6.2.5. Mikroextrakce tuhou fází (MEPS).....	82
2.6.2.6. Dynamická extrakce na pevnou fází (SPDE).....	83
2.6.2.7. Monolitická rotační extrakce	85
2.6.2.8. Sorpční extrakce na míchadle (SBSE).....	86
2.6.2.9. Extrakce pomocí materiálů s velkými částicemi (LPS).....	88
2.6.2.10. Extrakce pomocí materiálů s omezeným přístupem (RAM).....	89
2.6.3. SPE založená na selektivních sorbentech.....	95
2.6.3.1. Molekulárně vtištěné polymery (MIPs).....	95
2.6.3.2. Imunosorbenty (ISs).....	97
2.6.3.3. Aptamery.....	98
2.6.4. Technika přepínání kolon (CSW).....	100
2.6.4.1. Konfigurace systému přepínání kolon.....	101
2.6.4.2. Parametry předkolon	102
2.6.4.3. Parametry techniky CSW	103
2.6.4.4. Výhody a nevýhody CSW	105
2.6.4.5. Využití techniky CSW	106
VÝSLEDKY A DISKUZE.....	108
A. Přehled publikovaných prací	108
B. Komentáře k publikovaným pracím	109
B.1. Využití RAM a CSW v HPLC pro přímou analýzu léčiv v biologickém materiálu	110
B.1.1. Komentář k práci č. 1: „Using restricted-access materials and column-switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices“	111
B.1.2. Komentář k práci č. 2: „Rapid and simple determination of vitamin A and vitamin E in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography“.....	112
B.2. Analýza statinů a jejich metabolitů v biologickém materiálu	114
B.2.1. Komentář k práci č. 3: „Pharmacodynamic of statins – development of the method for their determination in biological material“	115
B.2.2. Komentář k práci č. 4: „Ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin“	117
PŘÍLOHY	120
Příloha I	120
Příloha II.....	131
Příloha III.....	137
Příloha IV.....	145
ZÁVĚR	157
ZDROJE LITERATURY.....	159

ÚVOD

Trendem instrumentální analýzy posledních let je stanovování hladin léčiv, jejich metabolitů a dalších biologicky aktivních látek v biologickém materiálu, zejména v tělních tekutinách, jako jsou plazma, sérum, plná krev, moč, sliny, mozkomíšni mok a další.

Stanovení hladin biologicky aktivních látek v biologickém materiálu má spoustu využití. Zejména je to sledování lékových hladin v průběhu terapie, tzv. terapeutické monitorování léků, jehož cílem je určit správný režim dávkování léků, dosáhnout jejich optimální účinné koncentrace, zabránit vzniku toxických vedlejších účinků, možnost sledovat plynule změny v průběhu terapie a přizpůsobit ji aktuálnímu stavu pacienta. Další oblastí je toxikologie, kde je potřeba rychle stanovit hladiny návykových látek v organismu či hladiny léčiv v případě jejich předávkování. Dále je možné sledovat přítomnost a koncentrace různých endogenních látek během fyziologických či patologických stavů.

Pro stanovení těchto látek se nejčastěji používají chromatografické separační techniky jako HPLC a GC, které umožňují v rámci jedné analýzy separaci, identifikaci a stanovení směsi látek. Tyto metody jsou však velice citlivé na předúpravu vzorku před vlastní analýzou. Biologický materiál je zpravidla velice složitá komplexní směs navzájem se ovlivňujících složek, která obsahuje spoustu balastních látek (zejména proteinů), jejichž přítomnost ve vyšetřovaném vzorku je neslučitelná s chromatografickými metodami. Proto je příprava vzorků většiny biologických materiálů před analýzou nezbytná a výrazně ovlivňuje výsledek stanovení i životnost chromatografických kolon.

Dosud nepoužívanějšími technikami přípravy vzorku k analýze jsou tradiční extrakční techniky LLE a SPE. Tyto techniky jsou však velice pracné, časově náročné, obtížně automatizovatelné, spotřebovávají velké objemy vzorků i organických rozpouštědel, vzniká při nich velké množství toxického odpadu, obsahují velký počet kroků, při kterých hrozí chyba analytika. Příprava vzorku k analýze zabírá s použitím těchto technik až 70 % jejího celkového času, proto se zde objevují obdobné trendy jako u chromatografických metod, tzn. zkrácení doby trvání, snížení spotřeby vzorku a organických rozpouštědel, snížení nákladů na analýzu, plná automatizace celého procesu, zvýšení účinnosti a selektivity.

Trendem posledních let v úpravě vzorku k analýze je také využití tzv. on-line extrakce, tedy extrakce probíhající na speciálních předkolonách přímo v chromatografickém systému. Nejčastěji se k tomu používají extrakční předkolony plněné RAM či LPS, zapojené do HPLC technikou přepínání kolon přes vícecestný přepínací ventil. Tyto sorbenty byly vyvinuty speciálně pro nástřik předem neupravených vzorků biologických materiálů. Vzorek je nadávkován autosamplermem do proudu promývací mobilní fáze. Na extrakční předkoloně dojde k zachycení a zakoncentrování malých molekul stanovených analytů, zatímco vysokomolekulární balastní látky jsou vymyty do odpadu. Následuje přepnutí přepínacího ventilu a zadržené analyty jsou analytickou mobilní fází přeneseny na separační kolonu, kde dojde k jejich separaci. Následuje detekce separovaných analytů v detektoru. Tyto moderní extrakční předkolony umožňující on-line extrakci přímo v chromatografickém systému splňují téměř všechny současné požadavky na přípravu vzorku k analýze, hlavně její vysokou rychlost, plnou automatizaci, vysokou výtěžnost a nízkou cenu a jsou tedy vhodné pro přípravu zejména velkých sérií vzorků k analýze.

CÍL PRÁCE

Hlavním cílem experimentální části disertační práce byl vývoj, optimalizace a validace HPLC metod pro stanovení léčiv, jejich metabolitů a dalších biologicky aktivních látek v biologickém materiálu, zejména v séru a v plazmě. Nedílnou součástí metod byl vývoj a optimalizace technik přípravy vzorku před vlastní chromatografickou analýzou, se zaměřením hlavně na SPE a on-line extrakce přímo v chromatografickém systému pomocí speciálních extrakčních předkolon plněných RAM, zapojených do HPLC s technikou přepínání kolon (CSW).

Předmětem první části disertační práce bylo sumarizovat všechny možné preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření, od přípravy pacienta na odběr vzorku biologického materiálu, přes samotný odběr, transport vzorku do laboratoře, až po první zpracování vzorku před analýzou. Dále pak podat přehled a základní informace o nejčastěji používaných tradičních technikách přípravy vzorku biologického materiálu k analýze, zejména však o moderních extrakčních technikách, splňujících všechny současné nároky moderní instrumentální analýzy.

Druhá, experimentální část, byla rozdělena podle typu stanovovaných analytů a podle techniky přípravy vzorků biologického materiálu na dva tematické okruhy.

Cílem prvního bylo vyvinout a validovat metodu pro současné stanovení vitamínu A a vitamínu E v biologickém materiálu (plazma, sérum) s využitím on-line extrakce přímo v HPLC systému, používajícím moderní extrakční předkolony plněné RAM, zapojené do systému technikou přepínání kolon.

Cílem druhého tematického okruhu experimentální části disertační práce bylo vyvinout a validovat metodu pro současné stanovení statinů (simvastatinu, atorvastatinu a jejich biologicky aktivních metabolitů) v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích s využitím tradiční SPE k přípravě vzorků před analýzou.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Preanalytické vlivy na výsledek laboratorního vyšetření

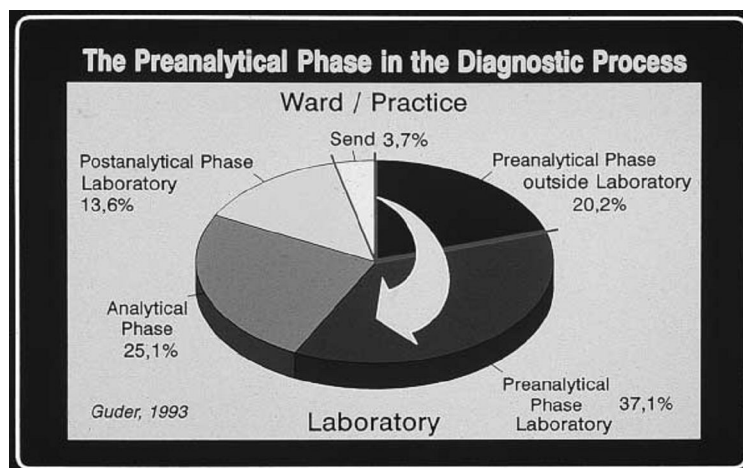
Výsledky laboratorních vyšetření jsou pro lékaře důležité v první řadě k účelům diagnostickým, nesporný význam však mají také při sledování průběhu nemoci, monitorování léčby, určování prognózy onemocnění, ale i v preventivních či screeningových programech. Dle Zimy (1) je až 70 % lékařských rozhodnutí u hospitalizovaných pacientů v USA učiněno na základě výsledku laboratorního vyšetření. V ČR podobná statistika dosud provedena nebyla, dají se však očekávat podobné výsledky. Pro získání správného výsledku je však nezbytné respektovat určitá pravidla, neboť existuje obrovské množství faktorů, které mohou výrazně ovlivnit získaný výsledek (2).

Při indikaci laboratorního vyšetření musí lékař vždy pečlivě zvážit jeho přínos. Prakticky každé laboratorní vyšetření (zejména odběr materiálu) nese určité riziko pro pacienta, což nesmí být opomíjeno. Vyšetření je nutné volit v určitém algoritmu a vybírat ta co nejvíce specifická pro daný problém. Z hlediska indikace vyšetření a jeho případného opakování hraje podstatnou roli znalost charakteristiky vyšetřovaného analytu, především jeho biologický poločas, rychlost syntézy nebo degradace při patologickém procesu (1).

Celkovou dobu každého laboratorního vyšetření, tzn. čas od ordinace lékařem až po obdržení výsledku z laboratoře, můžeme rozdělit na tři jednotlivé fáze: preanalytickou, analytickou a postanalytickou. Preanalytická fáze laboratorního vyšetření je definována jako soubor postupů a operací od indikace vyšetření po zahájení analyzování vzorku, tzn. že zahrnuje přípravu vyšetřované osoby na odběr, vlastní odběr biologického materiálu, uchování a transport biologického materiálu do laboratoře a případné uchování materiálu v laboratoři či jeho přípravu před samotným vyšetřením. Analytická fáze se zabývá samozřejmě samotnou analýzou vzorku, postanalytická fáze zejména správnou interpretací získaných výsledků (3, 4).

K ovlivnění výsledku laboratorního vyšetření může dojít během všech tří fází. Nejdůležitější z hlediska možného ovlivnění výsledku je fáze preanalytická, proto zde bude probrána podrobněji. Na rozdíl od analýzy vzorku, která se řídí zásadami správné

laboratorní praxe (SLP) a je kontrolována systémem kontroly kvality (interní, externí), je vliv preanalytických faktorů méně známý a také méně kontrolovaný, nicméně také může výsledek ovlivnit zásadním způsobem. Riziko ovlivnění výsledku v preanalytické fázi vzrůstá také z důvodu, že se jedná o časově nejdelší fázi (viz obr. 1) na které se podílí velké množství personálu - lékař, sestra, sanitář, laborant (5).



Obr. 1 Doba trvání jednotlivých fází laboratorního vyšetření - průměrné hodnoty (2)

Snahou této kapitoly je vytvořit přehled preanalytických vlivů a ukázat, jak výrazně mohou ovlivnit výsledek laboratorního vyšetření. Tyto vlivy mohou způsobit buď naměření zcela chybné hodnoty, která u pacienta ve skutečnosti není (chybný výsledek), nebo může být hodnota naměřena ve vzorku správně, přesto se ale liší od očekávaného výsledku (např. chybný odběr). Kdybychom nevzali v úvahu preanalytické ovlivnění výsledku, došlo by i v tomto případě k jeho nesprávné interpretaci (4).

V preanalytické fázi mohou výsledek ovlivnit následující faktory:

- osoba pacienta;
- odběr vzorku biologického materiálu;
- transport vzorku;
- uchovávání vzorku před analýzou;
- příprava vzorku ke zpracování.

1.1. Osoba pacienta

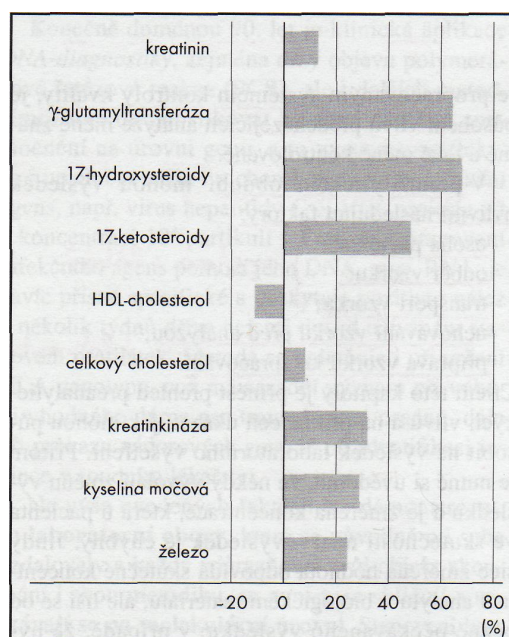
Pod pojmem “osoba pacienta“ se skrývají jak faktory, které nelze ovlivnit, ale při správném hodnocení výsledku je třeba vzít je v úvahu, ale také faktory, které jsou ve většině případů ovlivnitelné a jejichž vliv na výsledek laboratorního vyšetření lze eliminovat vhodnou přípravou pacienta na odběr (5).

1.1.1. Faktory neovlivnitelné

Mezi neovlivnitelné faktory patří pohlaví pacienta, jeho věk, rasa, etnická či sociální skupina, biologické cykly, gravidita, současně probíhající jiná nemoc, v úvahu je potřeba vzít také biologický poločas stanovované látky a v neposlední řadě je to také způsob stanovení referenčních hodnot, který je založen na principech pravděpodobnosti, což vede k tomu, že až 5 % zdravých jedinců má hodnoty ležící mimo referenční rozmezí. Jednotlivé faktory zde budou probrány podrobněji.

1.1.1.1. Pohlaví

Před dosažením puberty jsou rozdíly hodnot laboratorních vyšetření mezi dívkami a chlapci minimální. Také u dospělých je většina výsledků laboratorních testů na pohlaví nezávislá, nicméně existují metody, u kterých se referenční rozmezí u žen a mužů liší. Nejedná se samozřejmě pouze o aktivitu pohlavních hormonů, známé jsou také rozdíly např. v parametrech červeného krevního obrazu, v aktivitě některých enzymů, v koncentraci kyseliny močové, močoviny, ferritinu či železa. U většiny těchto parametrů platí, že muži mají o něco vyšší průměrné normální hodnoty než ženy. Přestože rozdíly nejsou zpravidla velké, je nutné je pro správnou interpretaci výsledků znát. Obr. 2 ukazuje procentuální odchylky hodnoty horní referenční meze vybraných biochemických parametrů u mužů a žen (3, 4, 5, 6).



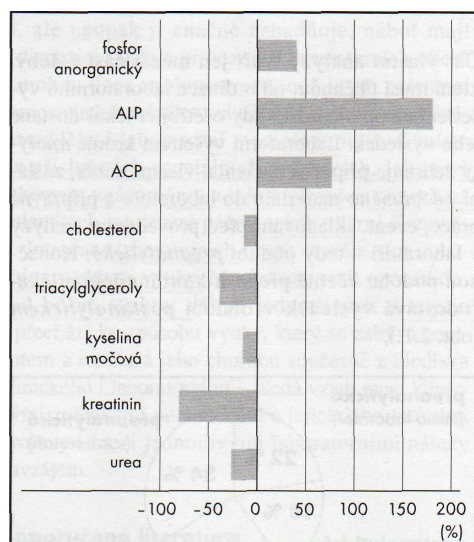
Obr. 2 Rozdíly horních referenčních mezí vybraných biochemických parametrů podle pohlaví (sloupce znamenají odchylky u mužů vzhledem k hodnotám u žen) (4)

1.1.1.2. Rasa, etnická či sociální skupina obyvatel

Mezi jednotlivými rasami se objevují drobné rozdíly u některých metabolických drah, které jsou dány např. odlišnou enzymatickou aktivitou. Např. černoši mají až dvojnásobnou aktivitu kreatinkinázy, asiáté vyšší aktivitu slinné amylázy, či naopak nižší aktivitu alkoholdehydrogenázy apod. Příslušníci etnických skupin se mohou lišit frekvencí výskytu určitých genů (mutací) a tím pádem i dědičných metabolických poruch či odlišnou četností výskytu některých onemocnění. Stejně tak se musí lišit hodnoty referenčních mezí konkrétních laboratorních vyšetření. Mimoto mohou být hodnoty některých laboratorních vyšetření ovlivněny také stravovacími návyky typickými pro určitou etnickou či dokonce sociální skupinu obyvatel (3, 4, 5).

1.1.1.3. Věk

Věk hraje také významnou roli ve správné interpretaci výsledků laboratorních vyšetření. Řada biochemických pochodů v organismu se v určitých fázích vývoje mění. Výrazné rozdíly se nacházejí zejména u novorozenců a malých kojenců. Většina testů má i v dětském věku jiné hranice referenčního rozmezí než dospělí (viz obr. 3). Nižší hodnoty dusíkatých katabolitů jsou příčinou pozitivní dusíkové bilance rostoucího organismu. Vyšší jsou naopak aktivity kyselá a alkalická fosfatázy a koncentrace anorganického fosforu jako výraz tvorby kostní tkáně; dále hodnoty hemoglobinu, počtu erytrocytů a hematokrit, charakterizující červenou krevní řadu. Výsledky některých laboratorních testů (např. clearance kreatininu) je nutné u dětí korigovat podle hmotnosti nebo lépe povrchu těla.



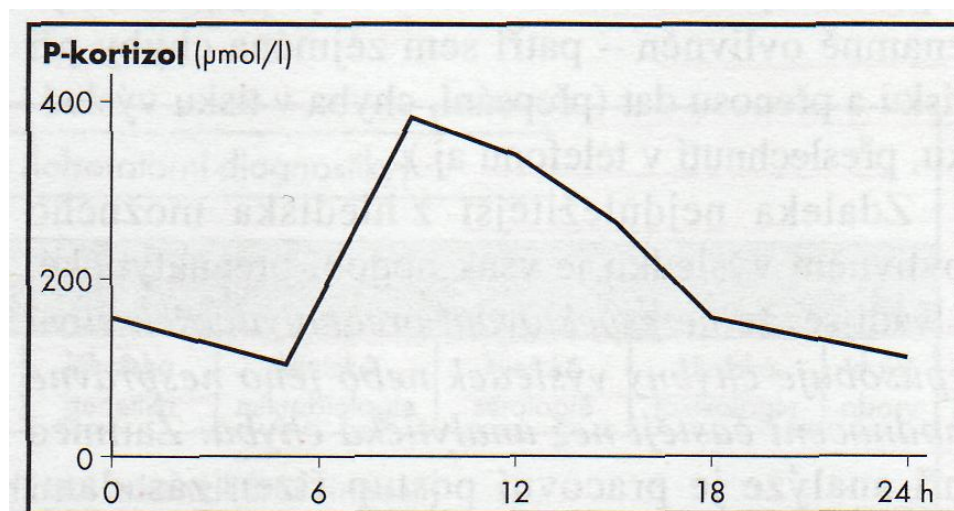
Obr. 3 Příklady biochemických parametrů s odlišnou horní referenční mezí v dětském věku (za základ zvoleny hodnoty u dospělých) (4)

Aktivita ALP je vysoká v dětství, maxima dosahuje v období 10 - 16 let věku, pak její hodnoty prudce klesají. Vysoké hodnoty v pubertě jsou dány především vývojem skeletu, zatímco takto vysoké hodnoty např. ve věku 40 nebo 50 let by znamenaly patologický nález. Ferritin je výrazně nižší u žen ve fertilním věku než u mužů, s přibývajícím věkem se však zvyšuje někdy až na hodnoty mužské populace. Tyto změny jsou dány fyziologickými ztrátami železa u fertilních žen (3, 4, 5).

1.1.1.4. Biologické cykly (cyklické změny)

Některé látky v lidském organismu podléhají chronobiologickým vlivům jak lineárním (věk), tak cyklickým. Z cyklických jsou nejvíce prostudovány změny denní (tzv. cirkadiánní, diurnální) a biologické - např. menstruační cyklus, u kterého jsou v měsíčním rytmu vylučovány ženské pohlavní hormony. O cyklech sezónních je v současné době pouze málo poznatků, ale jsou známy údaje o některých změnách např. v aktivitě aminotransferáz či hladině triacylglycerolů, které v průběhu ročních období mají svá maxima a minima s výchylkou více než 5 % (3, 5, 7).

Nejznámějším příkladem je denní cyklus kortizolu s maximem v ranních hodinách a večerním minimem s možnou odchylkou až 250 %, viz obr. 4 (4, 7).



Obr. 4 Diurnální rytmus v sekreci kortizolu - změny jeho koncentrace v plazmě v průběhu dne (4)

Cirkadiánním změnám nepodléhají jen hormony jako testosteron, prolaktin, tyroxin; enzymy aspartátaminotransferáza, alaninaminotransferáza, laktátdehydrogenáza či alkalická fosfatáza, ale také běžné analyty, jako je např. železo (změna až 50 %), draselné ionty, urea, kreatinin, anorganický fosfor či hemoglobin a další, viz tabulka 1.

Tab. 1 Příklady vybraných laboratorních metod, jejichž výsledky podléhají diurnálnímu rytmu (4)

Analyt	Maximum	Minimum	Rozdíl v %	Příčina
kreatinin	večer	ráno	až 50	fyzická aktivita
glomerulární filtrace	ráno	večer	až 80	oběhové změny
železo	6-9 h	22-24 h	25 (až 100)	neznámá; někdy inverzní rytmus
celková bílkovina	ráno	večer	až 30	hemokoncentrace ráno
hemoglobin	ráno	večer	15-30	hemokoncentrace ráno
draslík	6-9 h	18-24 h	10	neznámá
anorganický fosfor	6-9 h	20-24 h	15	neznámá

1.1.1.5. Gravidita

Těhotenství výrazně ovlivňuje řadu biochemických dějů, zejména hormonálními vlivy. Dochází např. ke zvýšení hladiny plazmatických transportních proteinů, hemodiluci s poklesem celkové bílkoviny, albuminu, hemoglobinu), zvýšení tělesného objemu a glomerulární filtrace s poklesem koncentrace kreatininu a močoviny v séru, snížení železa, ferritinu, zvýšení proteinů akutní fáze. Zejména v posledním trimestru stoupá koncentrace cholesterolu. Navíc se během gravidity v krvi, příp. v moči matky objevují bílkoviny a další látky produkované trofoblastem nebo orgány plodu, hlavně lidský choriový gonadotropin (hCG), beta1-těhotenský specifický glykoprotein (SP1-beta), alfa1-fetoprotein (AFP), placentární alkalická fosfatáza, estrogenery a jejich metabolity atd. (3, 4, 5, 6).

Fyziologických změn, která nastávají v průběhu těhotenství je samozřejmě podstatně více, zde je uvedeno pouze několik ilustrativních příkladů. Důležité však je, aby lékař vliv těhotenství na výsledek laboratorního vyšetření znal a zohlednil jej v interpretaci.

1.1.1.6. Současně probíhající jiná nemoc

Výsledky laboratorních vyšetření mohou být ovlivněny také jinou současně probíhající chorobou či léčbou, než pro kterou je nemocný vyšetřován. To bývá problémem zejména u pacientů v akutním stavu, kdy často chybí údaje o pacientovi. Lékař pak musí řešit akutní stav, který často s chronickým onemocněním nesouvisí, aniž by věděl, jakým ještě onemocněním pacient trpí a jak se léčí.

Příkladem může být např. krvácející pacient po autonehodě v bezvědomí, který má prodloužené základní koagulační testy. Lékař z těchto výsledků těžko pozná, zda pacient neužívá dlouhodobě antikoagulační léčbu či zda se nejedná o hemofilika, nebo jestli výsledky odpovídají stavu krvácení. U pacienta s chronickou aktivní hepatopatií je zase poměr aminotransferáz podobný jako u infarktu myokardu; u pacienta s aktivní revmatoidní artritidou je výrazně zvýšená hodnota C-reaktivního proteinu či antistreptolyzinu O jako u některých angín atd. (4, 5).

V takových případech může vést pozitivita uvedených testů při neznalosti základního onemocnění k chybným závěrům a k zahájení nesprávné terapie.

1.1.1.7. Biologický poločas stanovované látky

V případě akutních nebo rychle se měnících stavů je nutné vzít v úvahu biologický poločas stanovované látky. Znalost rychlosti metabolismu látek v organismu je důležitá zejména v toxikologii a při monitorování hladin léků. Zde je pozdě odebraný materiál v podstatě zbytečné vyšetřovat, neboť získané hodnoty budou zkreslené a v některých případech úplně nepoužitelné (8, 9).

Příkladem může být rozdíl ve vyšetřování dlouhodobé a krátké malnutrice. Tu dlouhodobou lze sledovat jakýmkoli bílkovinným reaktantem např. albuminem s relativně dlouhým biologickým poločasem, zatímco krátkodobou můžeme pozorovat pouze pomocí bílkovin s krátkým biologickým poločasem (např. transferin, prealbumin). Biologický poločas stanovované látky, resp. doba od požití dané látky je rozhodující u všech toxikologických vyšetření (4).

1.1.1.8. Způsob stanovení referenčních hodnot

Stanovení referenčních mezí laboratorních vyšetření se provádí změřením daného parametru u vybrané referenční skupiny zdravých dobrovolníků. Naměřená data jsou statisticky vyhodnocena na principu pravděpodobnosti (většinou 95 %), což znamená, že až 5 % zdravých jedinců má hodnotu sledovaného parametru mimo toto stanovené referenční rozmezí, přestože jsou zdraví (4).

Proto je chybou lékaře považovat všechny hodnoty ležící mimo uvedené referenční rozmezí za patologické, neboť až 5 % zdravých osob může mít naměřené výsledky mimo referenční rozmezí, tudíž se jedná o výsledky falešně pozitivní.

1.1.2. Faktory ovlivnitelné

Všechny níže uvedené faktory nejsou samozřejmě ovlivnitelné ve všech případech. Těžko bude například pacient v akutním stavu před odběrem lačnit, dostatečně hydratovat či v tělesném klidu. Stejně tak nikdy nelze zcela odstranit psychický stres před odběrem či u silného kuřáka vliv kouření. Obézní člověk také najednou nezhubne. Některé léky ovlivňující výsledek testu musí brát pacient dlouhodobě a nelze je tedy před vyšetřením vysadit či nahradit léky jinými, které výsledek vyšetření neovlivní.

1.1.2.1. Hmotnost organismu

Hmotnost organismu má vliv na koncentrace některých analytů změnou distribučních objemů. S obezitou pozitivně koreluje např. koncentrace cholesterolu a lipoproteinů (zejména LDL), triacylglycerolů, kyseliny močové, kortizolu či inzulínu (3, 4, 5).

1.1.2.2. Fyzická aktivita (zátěž)

Fyzická aktivita má vliv zejména na složení tělních tekutin, velikost těchto změn však závisí na její délce, intenzitě a na trénovanosti jedince. Zatímco akutní silová a vyčerpávající zátěž zvyšuje anaerobní metabolismus, vytrvalostní zátěž metabolismus aerobní. Zároveň je třeba si uvědomit, že velká fyzická námaha je pro každého jedince jiná, např. pro ortopedického pacienta je to zvýšené dechové úsilí, může to být křečový stav ad. (3).

Během zátěže dochází k přesunu tekutin z intravazálního do intersticiálního prostoru, čímž dochází k hemokoncentraci, v séru stoupá koncentrace celkové bílkoviny, látek vázaných na bílkoviny, zvyšuje se koncentrace hemoglobinu a hodnota hematokritu. Zvyšuje se utilizace substrátů - glykémie zpočátku nepatrně stoupá, po delší zátěži po vyčerpání glykogenových zásob klesá, rovněž klesá koncentrace triacylglycerolů a celkového cholesterolu, naopak se zvyšuje koncentrace volných mastných kyselin. Zvyšuje se sekrece inzulínu a aktivita enzymů souvisejících s činností svalů (kreatinkinázy, aspartátaminotransferázy, laktátdehydrogenázy), koncentrace myoglobinu a bilirubinu. Dlouhotrvající aktivita vede k hypoglykémii, vlivem zvýšeného anaerobního metabolismu stoupá koncentrace laktátu v krvi a klesá hodnota pH. Z důvodu centralizace krevního oběhu klesá clearance kreatininu a stoupá

močovina. Také dochází ke stimulaci sekrece kortizolu s narušením jeho diurnálního cyklu. Mění se koncentrace mnoha hormonů (4, 10).

Po skončení zátěže dochází k postupné normalizaci hodnot různou rychlostí. Zatímco např. kreatinkináza klesne na původní hodnoty za 3-5 dní, koncentrace laktátu se srovná za několik desítek minut (5).

1.1.2.3. Psychický stres

Stres často doprovází závažnější onemocnění, lékařský výkon nebo třeba jen odběr krve, zejména u dětí či anxiózních pacientů. Při stresu dochází k aktivaci sympatického nervového systému a k vyplavení hormonů kůry i dřeně nadledvin a jejich metabolickým účinkům, jako je hyperglykémie, vzestup koncentrace volných mastných kyselin či změna koncentrace minerálů v těle ad. (3, 4, 5, 6).

1.1.2.4. Vliv potravy, alkoholu a tekutin

Složení a množství přijímané potravy a tekutin ovlivňuje různými mechanismy řadu vyšetřovaných parametrů. Z důvodu příjmu potravy se vyplavují některé hormony a enzymy, vlivem inzulínu dochází např. k poklesu draselných iontů a fosfátů. V případě nedodržení požadované doby lačnění před odběrem jsou ovlivněny nejvíce koncentrace glukózy, železa, lipidů a alkalické fosfatázy. Výsledkem laboratorních vyšetření je pak falešná hyperglykémie, hypertriacylglycerolémie, zvýšená koncentrace volných mastných kyselin, změny v zastoupení lipoproteinových frakcí, ad. Jaké parametry budou ovlivněny záleží do jisté míry také na složení potravy – zatímco strava bohatá na proteiny zvyšuje zejména fosfáty, močovinu a kyselinu močovou, strava bohatá na tuky naopak podíl dusíkatých látek (např. kyseliny močové) snižuje a strava bohatá na sacharidy snižuje koncentraci triacylglycerolů, cholesterolu a celkové bílkoviny. Složení stravy také ovlivňuje pH moči. Zelenina a ovoce ji alkalizují, maso a tučná strava okyselují. Výsledky laboratorních vyšetření ovlivňují také některé dlouhodobé stravovací návyky (např. vegetariánství) či příjem určitých látek ovlivňujících specifické metabolické cesty, např. kofeinu, který zvyšuje hladinu katecholaminů, koncentraci glukózy a koncentraci volných mastných kyselin (3, 4).

Příjem tekutin má vliv na hustotu moči, ale také na změnu koncentrace některých látek v krvi. Pacient, který jde ráno na odběr krve a od večera nejí a nepije, může mít známky hemokoncentrace, tzn. vzestup celkové bílkoviny, hemoglobinu, hematokritu, někdy dokonce mírný vzestup koncentrace močoviny v séru. Výsledky

laboratorních vyšetření výrazně ovlivní také konzumace alkoholu. Zde je ovšem nutné rozlišit, zda se jedná o akutní nebo chronický abúzus. Jednorázové požití alkoholu v mírné až střední dávce ovlivňuje laboratorní testy minimálně. Při akutním abúzu se zvyšují hlavně triacylglyceroly a aldosteron a naopak klesá prolaktin, antidiuretický hormon a kortizol. Při chronickém abúzu se zvyšují jaterní enzymy alaninaminotransferáza, aspartátaminotransferáza, dále kortizol, adrenalin a estradiol, laktát a kyselina močová. Naopak dochází k hypoglykémii a ketoacidóze (5, 6, 10).

1.1.2.5. Kouření

Kouření ovlivňuje koncentraci řady analytů, zejména působením nikotinu. Ten působí na metabolismus glukózy, zvyšuje hladinu cholesterolu a triacylglycerolů, kortizolu, olova, kadmia a stimuluje sekreci žaludeční šťávy. Naopak snižuje koncentraci imunoglobulinů a vitamínu B12. Dále výrazně zvyšuje podíl karbonylhemoglobinu a koncentraci thiokyanatanů v séru (3, 5).

Méně výrazně ovlivňuje kouření koncentraci fibrinogenu, hemoglobinu, železa a karcinoembryonálního antigenu. Mimo to může ovlivnit rychlost metabolismu některých léků. Prostřednictvím volných radikálů zvyšuje oxidaci LDL a snižuje koncentraci vitamínu C (4).

1.1.2.6. Léky a drogy

Léky a drogy mohou ovlivnit výsledky laboratorních vyšetření několika způsoby. Buď mají vliv na in vivo biologické procesy, kde nejčastěji působí indukci nebo inhibici enzymů, ovlivňují vazbu na transportní bílkoviny, či působí cytotoxicky; anebo interferují in vitro při vlastním stanovení, paralelní reakcí s činidly používanými při analýze. Několik příkladů analytické interference léčiv na laboratorní vyšetření je uvedeno v tabulce 2. Protože se jedná o obrovskou skupinu látek, je prakticky nemožné zobecnit jejich vliv na jednotlivé laboratorní testy (11).

Jako léčivé přípravky se mohou podávat i samotné stanovované látky (např. infúze roztoku glukózy, aminokyselin, minerálů či tukových emulzí). Při velké rychlosti podání infúze či špatném načasování odběru může být jejich koncentrace v krvi ovlivněna a naměřený výsledek nemusí odpovídat reálné hodnotě. Podobně mohou být výrazně ovlivněny výsledky koagulačních testů, pokud je krev na vyšetření odebrána z kanyly, nedostatečně promyté od heparinu, podávaného jako antikoagulační léčivo.

Předem je potřeba upozornit laboratoř nebo s ní zpětně konzultovat nejasný nález, který může souviset s medikací pacienta. Příbalové letáky všech léčiv uvádějí informace o možných interferencích přípravku a možnostech ovlivnění laboratorních testů. Interference léčiv jsou důležitým faktorem a je třeba s nimi počítat při interpretaci laboratorních výsledků (4, 5).

Tab. 2 Příklady analytické interference vybraných léčiv na laboratorní vyšetření (12)

Vyšetření	Snižuje	Zvyšuje
Amyláza	Chlormezanon, Ibuprofen, Karbamazepim, Indometacin	Homogentisát, Levodopa
ALT	Homogentisát, Erytromycin, Diazepam, Cefalotin, Dihydralazinsulfát, Indometacin	nezjištěno
AST	Dihydralazinsulfát, Homogentisát, Metronidazol	Chlorpromazinchlorid
Bilirubin	Askorbová kyselina	Dihydralazinsulfát, Furosemid, Levodopa, Methyldopa
Celková bílkovina	Askorbová kyselina, Levodopa	Diazepam
ALP	Penicilamin	Homogentisát
Fosfor anorganický	nezjištěno	Amilorid, Prokainpenicilin G
Glukóza	Askorbová kyselina, Dihydralazinsulfát, Homogentisát, Levodopa, Penicilamin, Sulfametin	Diazepam, Erytromycin
Kreatinin	Dihydralazinsulfát	Askorbová kyselina, Cefalotin, Diazepam, Efedrinchlorid, Fenytoin, Gentamicinsulfát, Glibenklamid, Homogentisát, Levodopa, Merkaptopurin, Methyldopa, Prokainpenicilin G
Kyselina močová	Alopurinol, Aminofenazon, Askorbová kyselina, Dihydralazinsulfát, Fensuximid, Homogentisát, Ibuprofen, Indometacin, Ketofenylbutazon, Kofein, Levodopa, Methyldopa, Penicilamin, Streptomycinsulfát, Tolbutamid, Xantinnikotinát	Chlortalidon, Diazepam, Fluorouracil
Močovina	Homogentisát, Levodopa, Methyldopa	nezjištěno

1.1.2.7. Operace

Každá operace je výrazným zásahem do rovnováhy uvnitř organismu a může tedy značně ovlivnit laboratorní vyšetření. Změny mohou být způsobeny podaným narkotikem (častá hepatotoxicita), řezem svalovou tkání a jejím zhmožděním, což vede ke vzestupu aktivity enzymů kreatinkinázy, aspartátaminotransferázy, laktátdehydrogenázy, koncentrace myoglobinu a k uvolnění velkého množství tkáňového faktoru, či hormonální odpovědí na stres, která ovlivňuje prostřednictvím hormonů dřeně a kůry nadledvin řadu metabolických dějů včetně vzestupu koncentrace bílkovin akutní fáze. Během operace dochází zpravidla ke ztrátě krve, tudíž dochází k poklesu parametrů krevního obrazu a k aktivaci koagulace a následně fibrinolýzy, což vede opět ke změnám některých laboratorních parametrů (4, 5).

1.1.2.8. Zevní prostředí

Nemalou měrou ovlivňuje laboratorní parametry také zevní prostředí, ve kterém daný jedinec žije. Jedná se např. o nadmořskou výšku, teplotu prostředí, ale také geografickou lokalizaci. Na tyto faktory je třeba dát pozor zejména u cizinců či osob dlouhodobě působících v zahraničí. Příkladem může být cestování přes časová pásma, které se projevuje retencí sodných iontů a tekutin s normalizací za 2 dny po návratu. Dobře známý je vliv dlouhodobějšího pobytu ve vyšších nadmořských výškách na nárůst hodnot červeného krevního obrazu, čehož záměrně využívají během tréninku sportovci (3).

1.1.2.9. Mechanické vlivy

Mechanické poškození jako např. svalové trauma či obyčejná intramuskulární injekce zvyšují aktivitu aminotransferáz, kreatinkinázy a koncentraci myoglobinu. Tlak dělohy ve vysokém stupni těhotenství zvyšuje aktivitu alaninaminotransferázy. Digitální vyšetření prostaty či delší jízda na kole zvyšují aktivitu prostatického specifického antigenu. Při maratónském běhu stejně jako při chlopenních náhradách jsou mechanicky poškozovány erytrocyty s následnou hemolýzou a zvýšeným výskytem schistocytů v obarveném nátěru periferní krve (3).

1.2. Odběr vzorku biologického materiálu

Vysoká kvalita provedení odběru vzorku biologického materiálu je nesmírně důležitá, neboť výsledek laboratorního vyšetření z nesprávně odebraného vzorku může

být výrazně nepřesný. V některých případech nám špatný odběr dokonce zcela znemožní získat jakýkoli výsledek vyšetření (např. sražený materiál na hemokoagulační vyšetření, který se srazil z důvodu nedostatečného promíchání odebrané krve s protisrážlivým činidlem ve zkumavce odběrovou sestrou bezprostředně po odběru). Abychom u každého vyšetření získali přesný a správný výsledek, musíme dodržet takový postup, který eliminuje negativní faktory ohrožující spolehlivost daného vyšetření (2).

K obecným zásadám správného odběru biologického materiálu patří především správná identifikace pacienta a přesná a jednoznačná identifikace odebraného materiálu. V závislosti na typu biologického materiálu je nutné vybrat správnou techniku odběru, mít k tomu správné odběrové pomůcky (mj. zkumavky s odpovídajícími stabilizačními nebo protisrážlivými činidly), postupovat předepsaným postupem a v neposlední řadě mít správně poučeného a připraveného pacienta. Důležité je také správné načasování odběru z důvodu cirkadiánních rytmů či lačnění a poloha pacienta při odběru (1, 13).

1.2.1. Odběr krve

Krev je nejčastěji odebíraný biologický materiál pro laboratorní vyšetření. Odběr není nikterak invazivní a pacienta zatěžující, výsledek má vysokou výpovědní hodnotu pro lékaře a zásadní význam pro stanovení správné diagnózy a následné léčby pacienta. Analýzou vzorku krve lze získat přesné informace o změnách ve složení vnitřního prostředí organismu. Na většinu laboratorních vyšetření se odebírá krev venózní (žilní). Méně často se odebírá krev kapilární (např. na stanovení glukózy v krvi, nebo k orientačnímu vyšetření krevního obrazu u malých dětí či onkologických pacientů). Nejméně se odebírá krev arteriální (tepenná), která se používá např. k vyšetření acidobazické rovnováhy a stanovení hodnot krevních plynů (5, 14).

1.2.1.1. Odběr venózní krve

Odběr venózní krve, jak již bylo uvedeno výše, je nejčastějším typem odběru krve a vlastně se jedná o nejčastěji odebíraný biologický materiál vůbec. V neakutních případech se provádí ráno, po 8 – 12 hodinovém lačnění. Pacient je poučen, že odpoledne a večer před odběrem má vynechat tučná jídla. Pokud bere léky, které lze vysadit, měl by tak učinit 3 dny před odběrem, v opačném případě je nutné uvést podávané léky na průvodce k vyšetření. O vysazení případné medikace musí vždy rozhodnout lékař. Ráno před odběrem nemá pacient žíznit. Doporučuje se vypít před

odběrem $\frac{1}{4}$ l vody nebo neslazeného čaje. Také by se měl vyvarovat nadměrné fyzické námaze a ráno před odběrem by neměl kouřit. Tato tzv. osobní příprava pacienta na odběr je rovněž nesmírně důležitá k dosažení správných výsledků laboratorních vyšetření, proto by měl být každý pacient před odběrem řádně poučen. Je samozřejmé, že takováto příprava na odběr není možná u akutních případů a často není možná ani u všech hospitalizovaných pacientů (15, 16).

1.2.1.1.1. Typy venózních odběrů

Venózní (žilní) odběry můžeme dále rozdělit podle typu požadovaných laboratorních vyšetření. Každý z těchto typů odběru vyžaduje dodržení jiných specifit, především správnou volbu odběrové nádoby, vhodné pořadí odběru v případě náběru více zkumavek najednou, správné načasování odběru, vhodnou přípravu pacienta před odběrem, apod.

- **Mikrobiologická vyšetření** – odběr tzv. hemokultury. Odebírá se plná krev do speciálních nádobek s živným agarem, který zajistí přežívání mikroorganismů do doby, než dojde ke zpracování vzorku v laboratoři. Odběrová souprava musí ochránit vzorek před vnější kontaminací. Důležité je, v případě odběru více zkumavek najednou, odebírat zkumavku na hemokultury jako první. Dále je nezbytné vhodně načasovat odběr z hlediska patofyziologického průběhu infekce. Nejvýhodnější je odebrat materiál v akutním stádiu infekčního onemocnění, před zahájením léčby chemoterapeutiky nebo antibiotiky. Žádanka na vyšetření musí obsahovat kromě standardních údajů také datum prvních příznaků infekčního onemocnění, případně antimikrobní léky, jakými je pacient v současnosti léčen (17).
- **Sérologická/ imunologická vyšetření** – odebírá se většinou plná srážlivá krev do zkumavek bez protisrážlivého činidla, která slouží ke stanovení hladiny protilátek v séru. Při odběru více zkumavek najednou se odebírá krev na sérologické vyšetření hned po odběru hemokultury. Na některá imunologická vyšetření se používá nesrážlivá krev odebraná do zkumavek s citrátem sodným, heparinem či K_3EDTA jako protisrážlivými činidly. U infekčních onemocnění se zpravidla sérologické vyšetření opakuje (např. po 1-3 týdnech) k posouzení dynamiky titru protilátek (18).

- **Biochemická vyšetření** – odebírá se převážně plná srážlivá krev do zkumavek bez protisrážlivého činidla. Odběr na biochemická vyšetření není nikterak specifický, stačí se řídit obecnými zásadami odběru žilní krve. Pouze omezené množství biochemických vyšetření se provádí z nesrážlivé krve. V těchto případech se jako antikoagulační činidlo nejčastěji používá K_3EDTA (19).
- **Toxikologická vyšetření** – odebírá se nejčastěji srážlivá krev do zkumavek bez protisrážlivého činidla, někdy nesrážlivá krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem. Vyšetřuje se buď plná krev, sérum či plazma. Tyto materiály se používají hlavně ke kvantifikaci již známé látky, ale je možné je použít i ke screeningu. Pro správné načasování odběru je potřeba znalost farmakokinetiky, hlavně distribuce látky v organismu, metabolismus a rychlost jejího vylučování z organismu. Na stanovení alkoholu nebo jiných těkavých látek je nutno použít vhodnou, vzduchotěsně uzavíratelnou zkumavku a k dezinfekci kůže před odběrem nesmí být použita alkoholová dezinfekce (8).
- **Farmakologická vyšetření** – na terapeutické monitorování hladin léčiv se odebírá nejčastěji srážlivá krev do zkumavek bez protisrážlivého činidla, někdy nesrážlivá krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem. Při odběru vzorku na vyšetření je potřeba dát pozor na to, z jakého místa je krev odebírána, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku a ke vzniku falešně vysokých hodnot. Zvláště pokud se provádí odběr ze zavedené kanyly, je třeba provést taková opatření, aby se vzorek nekontaminoval infúzním roztokem. Jistější je provést odběr z jiné periferní žíly. Kritickým faktorem, který se výrazně uplatňuje při interpretaci získaných koncentrací léčiv, je doba odběru v návaznosti na dávkování léčiva. Proto je zde obzvláště nutné vyplnit na žádance přesný čas odběru, případně zda se odběr uskutečnil před podáním nebo po podání dávky, zejména u stanovení koncentrací antibiotik (9).
- **Hematologická vyšetření** – odebírá se plná krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem K_3EDTA . Odběr na hematologická vyšetření není nikterak specifický, stačí se řídit obecnými zásadami odběru žilní krve. Snad jen je zapotřebí odebrat do zkumavky správný objem krve, aby byl zachován poměr

s antikoagulačním činidlem, aby nedošlo ke sražení krve nebo naopak k jejímu naředění. Nutné je odebranou zkumavku ihned po odběru promíchat (20).

- **Hemokoagulační vyšetření** – odebírá se plná krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem citrátem sodným. U koagulačních vyšetření je nezbytně nutné uvádět na žádance případnou antikoagulační léčbu, která výsledky koagulačních testů výrazně ovlivní. Koagulační vyšetření jsou zvláště citlivá na správné množství krve odebrané do odběrové zkumavky. Nutně musí být zachován předepsaný poměr protisrážlivého činidla a odebrané krve. V případě, že je odebráno málo krve, dochází k jejímu naředění citrátem sodným, který jako antikoagulans způsobí prodloužení koagulačních testů. Naopak v případě, kdy je odebráno krve moc, může dojít ke sražení vzorku. Velice důležité je také okamžité promíchání krve s protisrážlivým činidlem ve zkumavce bezprostředně po odběru. Vzhledem k nízké stabilitě koagulačních faktorů je nutné provést laboratorní vyšetření do 2 hod. od odběru (20).
- **Molekulárně biologická vyšetření** – odebírá se plná krev do zkumavek s protisrážlivým činidlem, nejčastěji K_3EDTA , možné je také použití citrátu sodného či heparinu jako antikoagulans. Odběr na molekulárně biologická vyšetření není nikterak specifický, stačí se řídit obecnými zásadami odběru žilní krve. Vyšetření extrahumánního genomu lze provést jak z nesrážlivé krve (s K_3EDTA), tak z krve srážlivé. Odběr musí být proveden asepticky (21).

1.2.1.1.2. Odběrová místnost a pomůcky

Odběr žilní krve lze provádět pouze na pracovišti, které je k tomuto účelu náležitě vybaveno, včetně erudovaného personálu. Dle vyhlášky č. 195/2005 Sb. § 5 lze odběry biologického materiálu provádět pouze v odběrové místnosti, výjimečně v jiném prostoru, který splňuje základní hygienické požadavky pro odběr biologického materiálu. Povinné vybavení odběrové místnosti je dáno vyhláškou č. 49/2003 Sb. (22).

Mezi nezbytné pomůcky pro odběr žilní krve patří sterilní jednorázové odběrové jehly a stříkačky, zkumavky a vakuové zkumavky, stojánky na zkumavky, turnikety (škrtidla) s regulovatelným povolováním, dezinfekční prostředky, sterilní gázové

čtverce nebo tampóny, náplasti, jednorázové rukavice a instrukce o správném postupu odběru a faktorech, které vedou ke zkreslení výsledku vyšetření (10, 23).

1.2.1.1.3. Druhy odběrových systémů

Vybavení jednotlivých odběrových míst se mírně liší v závislosti na typu odběru venózní krve. Rozlišujeme dva typy odběru venózní krve, tzv. otevřeným a uzavřeným systémem.

Otevřený systém používá klasickou jehlu a injekční stříkačku. Proveďte se venepunkce a krev je jemným tahem pístu natažena do stříkačky. Poté je nutné pozvolna vyprázdnit stříkačku s odebranou krví do předem nachystané zkumavky. Nevýhodou tohoto systému je zvýšené riziko hemolýzy erytrocytů při rychlejším naplnění či vyprázdnění stříkačky přes jehlu. Tento typ odběru není ideální pro hemokoagulační a agregační vyšetření, neboť zde může docházet ke zvýšenému uvolňování tkáňového faktoru či k aktivaci krevních destiček. Navíc je při používání tohoto odběrového systému odběrový pracovník vystaven velkému riziku přenosu infekce vzhledem k přímé manipulaci s krví (14).

Uzavřený systém využívá v dnešní době většina pracovišť. Zajišťuje odběr krve přímo do uzavřených vakuových plastových zkumavek, které se napichují na speciální nástavec s injekční jehlou. Vakuum ve zkumavce zajistí její optimální naplnění, ke kterému navíc dochází standardní rychlostí, takže nedochází k hemolýze erytrocytů. Tím, že se krev odebírá přímo do zkumavky s požadovanou přísadou, nemusí se s odebranou krví po odběru dále manipulovat, snižuje se tak riziko kontaminace pracovníka krví a pacientovi se odebírá pouze opravdu potřebné množství krve. Zkumavka je sterilní a uzavřená, odebraný materiál se tedy nedostane do styku s vnějším prostředím. U tohoto typu odběru je také snazší odebrat pacientovi větší počet zkumavek krve z jednoho vpichu (10, 24).



Obr. 5 Uzavřený systém pro odběr venózní krve (25)

Pomůcky, které se používají v uzavřeném odběrovém systému, v současné době vyrábí několik firem. Mezi nejpoužívanější patří pístový systém Monovette od firmy Sarstedt, systém Vacuette od firmy Greiner Bio-one či systém Vacutainer od firmy Becton Dickinson. Jednotlivé zkumavky se liší přísadami a jejich využitím, pro jednoduchost odlišení používají všichni výrobci různobarevné zátky a polepky (viz obr. 6 a tab. 3).



Obr. 6 Odběrový systém Vacutainer firmy Becton Dickinson (24)

Tab. 3 Odběrový systém Vacutainer firmy Becton Dickinson a jeho využití (24)

Barva uzávěru	Přísada	Použití
Zlatá	Aktivátor srážení + dělicí gel	Biochemie ze séra
Zelená	Heparin lithný/sodný	Imunologie
Šedá	Fluorid sodný + oxalát draselný	Glukóza, laktát
Červená	Bez přísad	Biochemie ze séra, sérologie, imunologie ze séra
Modrá	Citrát sodný 1:9	Hemokoagulace
Fialová	K ₃ EDTA	Hematologie
Černá	Citrát sodný 1:4	Sedimentace erytrocytů
Žlutá	ACD	Imunohematologie
Růžová	K ₃ EDTA	Imunohematologie

1.2.1.1.4. Pracovní postup odběru venózní krve

Žádá-li lékař o provedení laboratorního vyšetření, musí nejprve vyplnit tzv. požadavkový list neboli žádanku. Ta musí podle vyhlášky č. 195/2005 Sb. obsahovat následující údaje: jméno a příjmení pacienta, jeho rodné číslo, adresu místa trvalého bydliště, identifikační číslo zdravotnického zařízení a jeho adresu, jméno, podpis, razítko a telefonní číslo lékaře, žádajícího o vyšetření biologického materiálu, zdravotní pojišťovnu vyšetřované osoby, druh materiálu, datum a hodinu odběru materiálu,

případně datum prvních příznaků infekčního onemocnění, druh antibiotické či jiné (hlavně antikoagulační či antiagregační) terapie, klinickou diagnózu a požadovaná laboratorní vyšetření. Žádanka nesmí být během transportu kontaminována přepravovaným biologickým materiálem (22).

a) **Načasování odběru krve a příprava pacienta** – odběr se provádí zpravidla v ranních hodinách, protože koncentrace některých látek v krvi během dne kolísá. Speciální načasování odběru krve se provádí např. z důvodu monitorace farmakoterapie. Pacient by měl být před odběrem poučen o zásadách správné přípravy na odběr (6, 26).

b) **Příprava pomůcek** – je nutné mít předem nachystané všechny potřebné pomůcky k odběru na dostupném místě. Jsou to sterilní jehly, odběrové zkumavky, turniket, dezinfekce, gázové čtverečky, jednorázové rukavice, sterilní tampón, náplast (14).

c) **Identifikace pacienta** – je velmi podstatnou součástí postupu při odběru krve. Při identifikaci pacienta se nejprve řádně označí štítkem se jménem, příjmením a rodným číslem nachystané odběrové zkumavky. Poté se provede řádná identifikace pacienta, aby se zabránilo záměně vzorku.

d) **Ověření dodržení doporučených zásad, zejména dietních omezení, před odběrem** – učinit dotaz na dodržení lačnění, zda-li nebyla velká fyzická zátěž v předešlých dnech, jestli pacient před odběrem požil nějaké léky, případně jaké. Pacient by měl před odběrem pít, protože i mírná dehydratace vede k zahuštění krve, způsobuje problémy při odběru a ovlivňuje výsledky některých laboratorních testů.

e) **Kontrola dostupnosti všech pomůcek potřebných k odběru.**

f) **Seznámení pacienta s postupem odběru.**

g) **Poloha při odběru** – odběr by měl být proveden vsedě, u imobilních pacientů vleže. Je nutné zajistit vhodnou polohu paže, tj. podložení paže opěrkou v natažené pozici u sedících osob, u ležících zajištěním přiměřené polohy s vyloučením flexe v lokti. V poloze vestoje by se neměl odběr provádět, neboť stoupá hydrostatický tlak a dochází k přesunu tekutiny a iontů z plazmy do intersticia. Přitom se zvyšuje až o 10 %

koncentrace proteinů a krevních elementů, které kapilární stěnou neprocházejí. Dochází k zahuštění plazmy a posturálnímu stresu, čímž se aktivuje sympatikus, který spouští osu renin-angiotenzin-aldosteron s příslušnou fyziologickou odpovědí. Tyto hormony mají pak vestoje asi o 50 % vyšší koncentraci. Naopak při odběru vleže dochází ke snížení koncentrace těchto látek. K zajištění standardních podmínek odběru venózní krve by měl pacient před odběrem 15 minut sedět v klidu (1, 27).

h) **Výběr místa vpichu** – nevhodná je paže, na které jsou velké jizvy, hematomy, i paže se zavedenou infuzí. K odběru krve se zpravidla používají povrchové žíly horních končetin. Obvykle se odebírá z kubitální žíly ve fossa antebrachii nebo z ostatních žil v loketním ohbí, mohou se využít i žíly na hřbetu ruky a předloktí. Všechny tyto žíly bývají snadno viditelné, hmatné a mají široký průsvit. Vždy se vybírá co nejlepší žíla, která je měkká, pružná, po stlačení se znovu naplní. Naopak špatnou volbou je žíla vyvýšená, pohyblivá, která je často sklerotická, tvrdá, křehká a po nabodnutí jehlou často praskne (28).

i) **Řádná kontrola identifikačních údajů na odběrových zkumavkách**, kontrola pomůcek k odběru (kvalita jehly ve smyslu neporušenosti obalu spojená se zachováním sterility).

j) **Nasazení rukavic** – podle vyhlášky č. 207/1992 Sb. § 6 o hygienických požadavcích na provoz zdravotnických zařízení musí zdravotničtí pracovníci při odběru biologického materiálu používat povinně ochranné rukavice, které slouží k ochraně jejich i pacienta. Rukavice jsou jednorázové a na každého pacienta se používá nový pár (29).

k) **Zatažení paže odebírané osoby** – zatažení turniketu nad místem vpichu usnadňuje odběr tím, že dilatuje žílu, která je pak lépe hmatná a viditelná. Toto zaškrcení ovšem vede k ovlivnění kvality vzorku, již po 1 minutě dochází k přesunu tekutiny z cévy do intersticia a ke zvýšení koncentrace vysokomolekulárních látek až o 10 %. Také dochází k anaerobnímu metabolismu, což má za následek zvýšení koncentrace laktátu a draselných iontů až o 20 % s následnou acidózou. Dále dochází ke změnám v hemostáze, neboť se začne uvolňovat tkáňový faktor. Pokud je tedy turniket použit, neměla by doba jeho zatažení překročit 1 minutu. Po napíchnutí žíly je vždy nutné turniket ihned uvolnit. Nikdy by se totiž neměla nabírat krev stojící, ale proudící (30).

l) **Cvičení či pumpování paží při zataženém turniketu** – je podle nových studií naprosto nevhodné, proto se dnes nedoporučuje. Dochází tak k nárůstu koncentrací řady analytů, což zkresluje výsledek vyšetření (6, 30).

m) **Dezinfekce kůže v místě vpichu** – je povinnou součástí odběru krve, neboť je prevencí přenosu infekce do pacientova krevního oběhu. K dezinfekci se používají lihové roztoky, jodové tinktury či aerosolové přípravky. Dezinfekční roztok nanesený na místo vpichu je bezpodmínečně nutné nechat zcela zaschnout. V případě, že se začne s odběrem dříve, může dezinfekce potřísnit odběrovou jehlu, která po kontaktu s krví způsobí hemolýzu erytrocytů. Doba zaschnutí dezinfekčního roztoku je zároveň dobou expozice, potřebnou k usmrcení všech mikroorganismů (10, 28).

n) **Venepunkce** – zavedení jehly do žíly. Při odběru krve je nutné použít jehlu o dostatečném průsvitu, aby nedošlo k hemolýze erytrocytů. Při použití otevřeného i uzavřeného vakuového systému se nejprve stabilizuje poloha žíly přitlačením palcem ve vzdálenosti 2 – 5 cm pod místem vpichu, poté se provede venepunkce. Jakmile začne proudit do zkumavky/stříkačky krev, je potřeba uvolnit turniket. S jehlou v žíle se nesmí během odběru hýbat. Naplněné odběrové zkumavky s antikoagulačními přísadami je nutné bezprostředně po odběru promíchat (14, 31).

o) **Doporučené pořadí odběrů z jednoho vpichu** – pokud se odebírá z jednoho místa vpichu více odběrových zkumavek, musí se dodržovat následující pořadí odběru: 1. odběr na hemokulturu; 2. odběr do zkumavek bez protisrážlivých činidel; 3. odběr na hemokoagulaci; 4. odběr do zkumavek s ostatními protisrážlivými činidly v pořadí: heparinové, K₃EDTA, oxalátové a nakonec fluoridové zkumavky. Pokud se odebírá pouze krev na hemokoagulační vyšetření (zkumavky s citrátem sodným), neměla by se nikdy k vyšetření použít první odebraná zkumavka z důvodu zvýšené koncentrace tkáňového faktoru uvolněného z místa vpichu. Koagulační výsledky by tím byly výrazně ovlivněny (28).

p) **Ukončení odběru krve a ošetření pacienta** – po vyjmutí poslední odebírané zkumavky se místo vpichu zakryje i s jehlou gázovým čtvercem. Na ten se jemně zatlačí a pomalým tahem se odstraní jehla ze žíly. Přitom se musí dávat pozor, aby nedošlo ke kožnímu poranění pacientovy paže. Po odběru se za normálních okolností očistí místo

vpichu sterilní gázou, kterou by si měl pacient lehce přitlačovat po dobu alespoň 1 minuty, aby nedošlo k vylití krve a vzniku hematomu. Nakonec se místo přelepí náplastí (10, 23).

q) **Úklid pomůcek** – ihned po odběru se vyhodí jehly a veškerý další kreví kontaminovaný materiál do speciálních, k tomuto účelu určených nádob.

r) **Čas odběru krve** – datum, hodina a minuta provedení odběru se zaznamená na žádanku či do nemocničního informačního systému. Tam se také zaznamenají informace o případných komplikacích při odběru a identifikační údaje pracovníka, který odběr provedl. Do laboratoří provádějících požadovaná laboratorní vyšetření se co nejrychleji odešlou správně označené zkumavky s příslušnými požadavkovými listy.

Speciální pozornost je třeba věnovat odběrům krve ze zavedeného katetru, kanyly či portu. Zde vzniká mnoho chyb způsobených buď nedostatečným odpuštěním krve, tzv. „heparinové zátky“, která chrání daný vstup před ucpáním krevní sraženinou, nebo nabráním krve ze vstupu bezprostředně po aplikaci infúze s léčivem, které se ještě nestačilo dostatečně rozptýlit po organismu. V tomto případě by se měla použít k odběru jiná žíla, nejlépe na druhé ruce, aby nedošlo k ovlivnění výsledků (30).



Obr. 7 Postup odběru žilní krve vakuovým systémem (32)

1.2.1.2. Odběr kapilární krve

Odběry kapilární krve se provádějí pro stanovení glukózy při monitoringu diabetu, při stanovení glykovaného hemoglobinu či k orientačnímu vyšetření krevního

obrazu. Toto vyšetření není tak přesné jako vyšetření krevního obrazu z žilní krve, nicméně odběr kapilární krve je pro pacienty méně invazivní, proto se využívá zejména u batolat, malých dětí a onkologických pacientů (15, 20).

Odběr se provádí většinou v poloze vsedě. Příprava pacienta na odběr by měla být stejná jako při odběru venózní krve. Místem vpichu je obvykle boční strana posledního článku prstu ruky, případně ušní lalůček nebo pata u malých dětí. Před vpichem se provede dezinfekce pokožky. Opět platí, že dezinfekce musí zaschnout, v opačném případě by došlo k hemolýze erytrocytů nebo interferencím při vlastním stanovení. Vpich se provádí jednorázovou sterilní lancetou s definovanou hloubkou vpichu nebo sterilní odběrovou jehlou vpichem do podkoží. Hloubka vpichu nesmí překročit 2 mm, aby nedošlo k poškození hlubších podkožních struktur. První kapka po vpichu se setře buničinou, do další tvořící se kapky se ponoří konec kapiláry a krev se nasává kapilární silou do zkumavky, do které je kapilára zavedena (33, 34).

Odběr se musí provádět z dokonale prokrvených, nikoli podchlazených, cyanotických míst, protože pak se obtížně realizuje. Proto je vhodné, má-li pacient před odběrem prochládlé ruce, provést jejich prohřátí např. teplou vodní lázní. Důležité je vyhnout se násilnému vytlačování krve z prstu, aby nedocházelo ke kontaminaci materiálu tkáňovým mokem. V případě odběru kapilární krve na vyšetření krevního obrazu je potřeba zachovat poměr mezi odebranou krví a antikoagulačním činidlem, aby nedošlo k naředění krve a tím pádem k ovlivnění výsledků. Je také potřeba zajistit bezprostřední promíchání krve s antikoagulačním činidlem ve zkumavce, aby se nesrazila (4, 20).



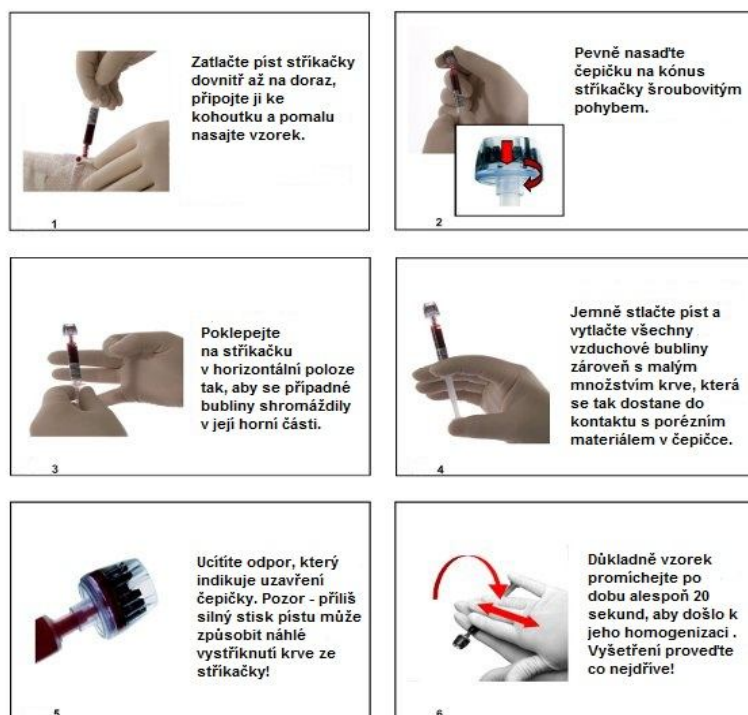
Obr. 8 Odběr kapilární krve z prstu (35)

1.2.1.3. Odběr arteriální krve

Jedná se o nejméně často realizovaný odběr krve. Provádí se nejčastěji k vyšetření acidobazické rovnováhy a krevních plynů, kdy se zjišťuje pH krve, parciální tlak kyslíku a oxidu uhličitého a procento okysličené krve v tepnách, proto se musí uskutečnit anaerobně. Z tohoto odběru je možné vyšetřit také jednotlivé frakce hemoglobinu (např. oxyhemoglobin, methemoglobin, ad.). Odběr smí provádět pouze lékař a pracoviště musí být k tomuto účelu náležitě vybaveno (15, 34).

Vhodnými místy odběru arteriální krve jsou arterie femoralis, brachialis, radialis, dorsalis pedis, u novorozenců také lebeční arterie. Pacient by měl před vlastním odběrem alespoň 5 minut v klidu ležet. Kromě dezinfekce místa vpichu se doporučuje také jeho anestézie. Odběr se provádí do kapiláry na tenké jehle nebo do upravené injekční stříkačky, jako antikoagulans se používá heparin lithný. Na jednotkách intenzivní péče se často zavádí arteriální katetr, který umožňuje opakované odběry (36).

V odběrové injekční stříkačce nesmí být po odběru žádné vzduchové bubliny. Pokud se přeci jen objeví, je nutné je před uzavřením stříkačky odstranit, neboť i 1 středně velká bublina v kapiláře může po promíchání způsobit vzestup parciálního tlaku kyslíku až o 5 kPa. Po odběru musí být stříkačka uzavřena vzduchotěsnou zátkou nebo speciálním uzávěrem. Nutný je také okamžitý transport do laboratoře a rychlé vyšetření, nejlépe do 10 minut při teplotě okolo 25 °C nebo do 2 hodin při teplotě 1 – 5 °C (36).



Obr. 9 Odběr arteriální krve (37)

1.2.2. Odběr moči

Hlavní výhodou moči jako biologického materiálu sloužícího k provedení laboratorního vyšetření je absolutní neinvazivnost odběru. Dále je to schopnost organismu zakoncentrovat stanovovanou látku do poměrně malého objemu moči. Při toxikologickém vyšetření se často využívá možnosti stanovit požadovanou látku či její metabolity delší dobu po jejím podání, než při stanovení z krve, plazmy či séra. Tzn., že i když už uplynula příliš dlouhá doba od podání látky a její koncentrace v krvi, plazmě či séru je již příliš nízká na stanovení, v moči se dá daná látka resp. její metabolity ještě pohodlně stanovit. Další výhodou moči je její snazší příprava k analýze, neboť má oproti plné krvi, plazmě či séru výrazně jednodušší složení, zejména neobsahuje tolik proteinů. Nevýhodou moči, zvláště pro toxikologická vyšetření, je závislost koncentrace filtrovaných látek na příjmu tekutin (38).

Pro základní kvalitativní vyšetření moči a močového sedimentu se používá vzorek první ranní moči, která je dostatečně zakoncentrována v močovém měchýři. Odebírá se tzv. střední proud do čisté lahvičky nebo do 10 ml zkumavky uzavíratelné víčkem. Na kvantitativní biochemické vyšetření moči, tzv. bilanční sběr, se sbírá veškerá moč za určité časové období (nejčastěji za 24 hodin). Pro mikrobiologické vyšetření je nutné odebrat moč aseptickým postupem (po předchozí hygieně genitálií) do sterilní zkumavky. Opět se odebírá střední proud. Vzorek je potřeba okamžitě odeslat do laboratoře (28, 34, 39).

1.2.3. Odběr stolice

Odběr stolice je opět neinvazivní, její zpracování je však obtížné a výpovědní hodnota poměrně malá. Během hospitalizace se sleduje např. pravidelnost a frekvence vyprazdňování, množství stolice a její barva. Dále se stolice vyšetřuje na přítomnost krve, nestrávené příčně pruhované svaloviny, nenatráveného škrobu, nenatrávených tuků a na přítomnost parazitů. Odběru stolice na některá vyšetření často předchází speciální dieta (39).

Na biochemická vyšetření včetně kvalitativního vyšetření na okultní krvácení se odebírá vzorek z vnitřní části stolice (maximálně velikosti čočky) do určeného odběrového kontejneru či do plastové zkumavky. V poslední době se používají tzv. testovací karty. Na mikrobiologická vyšetření se stolice odebírá buď sterilní rektální rourkou, nebo se provádí výtěr z rekta sterilní štětičkou, která se poté vkládá do sterilní

zkumavky a pečlivě se uzavře víčkem. Na parazitologické vyšetření se používá speciální souprava, která obsahuje 3 zkumavky a odběr se většinou opakuje obden. Odebírá se větší množství vzorku zevnitř stolice speciální skleněnou lopatkou. V případě detekce vajíček roupa dětského se provádí tzv. perianální stěr. Večer se nalepí na anální otvor lepící páska, která se ráno odlepí a nalepí na podložní sklo. Všechny odběry stolice je nutné co nejrychleji transportovat do laboratoře (28, 40).

1.2.4. Odběr sputa

Sputum je zmnožený sekret dýchacích cest. Odebírá se nejčastěji k mikrobiologickému vyšetření, při kterém se kultivují a určují kmeny bakterií, virů a plísní, jakožto původců infekčních onemocnění dýchacích cest. Sputum se také používá k cytologickému vyšetření, při kterém se zjišťuje původ, struktura, funkce a patologie buněk.

Pro mikrobiologické vyšetření je optimální ranní odběr. Nemocný si nejprve vyčistí a vypláchne ústa vodou, vyplivne sliny, zhluboka se nadechne a snaží se vykašlat hlenovitý vazký sekret z dolních cest dýchacích (sputum) do široké sterilní zkumavky, tzv. sputovky. Označená sputovka musí být spolu s žádankou ihned dopravena do laboratoře a ještě tentýž den zpracována. Zde je nesmírně důležitá rychlost transportu – delší doba transportu snižuje pravděpodobnost přežití některých důležitých, ale málo odolných původců onemocnění dolních cest dýchacích, jiné kmeny mohou naopak přerůst. Odběr je potřeba provést před započatím léčby (26, 41).

1.2.5. Výtěry a stěry

Výtěry se provádějí ze sliznic, stěry z kožních ploch a to sterilním vatovým tampónem uloženým ve sterilním obalu s transportní půdou, do kterého se tampón po odběru vrací zpět a odesílá do laboratoře. Nejčastěji se výtěry a stěry zasílají k mikrobiologickému a cytologickému vyšetření (39).

Výtěry se provádějí z mnoha lokalizací. Nejčastěji je to z krku, při kterém se otáčivým pohybem setře povrch mandlí nebo patrových oblouků. Při výtěru z nosu se zase otáčivým pohybem vytře nosní průduch. Pro výtěr z hrtanu a nosohltanu se používá speciální vatový tampón na drátku, který se ještě před odběrem ohne o hrdlo zkumavky do úhlu 60 – 90°. Častý je také výtěr z tonzil, rekta, případně z rány, kožního ložiska, dekubitu či bércového vředu. Součástí gynekologického vyšetření je pak výtěr z pochvy a z cervixu. Vzácnější je výtěr z oka a ucha (26).

Výtěry se provádí většinou před započítím léčby. Transport vzorků do laboratoře by měl být co nejrychlejší, přestože většina patogenů přežívá v transportní půdě 24 – 48 hodin a měl by být uskutečněn při laboratorní teplotě. Během uchovávání před analýzou se vzorky nikdy nesmí vkládat do lednice. Během samotného odběru je vždy zapotřebí setřít tampónem pouze požadovanou plochu a vyvarovat se kontaktu tampónu s okolní sliznicí, zvláště při odběru z dutiny ústní, kde se hodně bakterií vyskytuje přirozeně. Před výtěrem z dutiny ústní si nemocný nesmí čistit zuby, jíst, pít ani kouřit (41).

1.2.6. Odběr žaludečního obsahu, zvratků a výplach žaludku

Tímto odběrem se získávají vzorky žaludečních a duodenálních šťáv k biochemickým, mikrobiologickým a cytologickým vyšetřením, nebo žaludeční obsah na toxikologické vyšetření, které se provádí v časných fázích otrav potravinami, léky nebo alkoholem.

Odběr se provádí přes žaludeční sondu, z emitní misky při zvracení nebo při endoskopickém vyšetření. Řádně označený vzorek s průvodkou se ihned po odběru zasílá ve sterilní zkumavce do laboratoře k vyšetření (39).

1.2.7. Punkce

Punkce je výkon, při kterém se zavádí speciální punkční jehla do příslušné tělní dutiny nebo orgánu za účelem terapeutickým či diagnostickým. Provádí ji lékař za pomoci sestry v místnostech určených pro malé výkony s přísně aseptickým prostředím. Důležitá je fyzická, zejména pak psychická příprava pacienta a získání jeho informovaného souhlasu. Punkcí se nejčastěji odebírá mozkomíšní mok a tekutiny (výpotky) z peritoneální a pleurální dutiny. Lze však punktovat také např. koleno, cystu, štítnou žlázu, ale také kostní dřev z hrudní kosti (sternální punkce). Punkcí je také odběr plodové vody, tzv. amniocentéza nebo odběr pupečnickové krve, tzv. kordocentéza (42).

Místo odběru punktátu musí být uvedeno na žádance. Volba odběrové nádoby se řídí druhem požadovaného vyšetření. Na biochemické a kultivační vyšetření se používají sterilní zkumavky. Na zhodnocení počtu buněk v punktátu se používají zkumavky s protisrážlivým činidlem K₃EDTA. Na cytologické vyšetření se používají buď plastové zkumavky bez přísad, nebo zkumavky s fixačním roztokem. Ze vzorku kostní dřevě se vytváří nátěr na sklíčko. Na cytogenetické vyšetření se používají sterilní plastové zkumavky (plodová voda) nebo zkumavky s heparinem lithným jako

antikoagulans (pupečnicková krev). Na molekulárně biologické vyšetření plodové vody i pupečnickové krve se používají sterilní zkumavky bez protisrážlivých činidel (26, 41).

Odběr mozkomíšního moku (likvoru) se provádí z páteřního kanálu při lumbální punkci, kdy se zavádí jehla do subarachnoidálního prostoru míšního kanálu, většinou mezi druhým až pátým lumbálním obratlem. Likvor se nechává volně odkapávat do sterilní zkumavky, ve které se odesílá 5-7 ml ke zpracování do laboratoře, nejčastěji k makroskopickému, mikroskopickému, biochemickému a cytologickému vyšetření. Transport materiálu spolu s žádankou do laboratoře musí být proveden okamžitě a teplota likvoru musí být až do zpracování 37 °C (15, 34).

Odběr tekutiny z peritoneální dutiny se provádí za účelem získání vzorku této tekutiny na laboratorní vyšetření a také z důvodu uvolnění tlaku na břišní orgány v případě jejího zmnožení a nahromadění. Pacient musí být před odběrem lačný, vyprázdněný. Odběr se provádí v polosedě, kvůli nahromadění tekutiny v dolní části břišní dutiny a samozřejmě sterilně. Odebraný řádně označený materiál je ihned odeslán do laboratoře (39).

Odběr tekutiny či vzduchu z pleurální dutiny se provádí opět sterilně punkční jehlou, na kterou je nasazený trojcestný kohout z důvodu zabránění vniknutí vzduchu do pohrudniční dutiny. Odebere se cca 15 ml punktátu, který je nutno ihned odeslat v označené zkumavce do laboratoře (39).

1.2.8. Biopsie

Biopsie je lékařský zákrok, při kterém se z lidského těla odebírá vzorek tkáně na cytologické nebo histologické vyšetření. Je to invazivní technika, kterou provádí pouze lékař za pomoci sestry v přísně aseptických podmínkách. Podle typu biopsie a druhu odebírané tkáně se zákrok provádí buď v celkové anestézii s hospitalizací nebo ambulantně s lokální anestézií. Biopsie vyžaduje informovaný souhlas pacienta (43).

Podle způsobu provedení odběru rozlišujeme různé typy biopsií: punkční (aspirační) biopsie, u kterých se tkáň odebírá speciální jehlou; excize, kdy je tkáň vyříznuta pomocí skalpelu nebo speciálních kleští při endoskopickém vyšetření; extirpace – obdoba excize, při které se ale odebírá celé podezřelé ložisko i s okolní tkání, místo pouhé části; punkční cytologie, kdy se odběr vzorku provádí pomocí běžné injekční jehly a odebírají se tak jen jednotlivé buňky k cytologickému vyšetření; kartáčková biopsie či stěr – pomocí speciálního kartáčku se sbírají buňky např. ze sliznice průdušek nebo buňky z děložního hrdla, ale také buňky bukalní sliznice, které

se používají jako zdroj DNA při určování paternity; výplachy (laváže) – nejčastěji do dýchacích cest se vpraví tekutina, která se poté odsaje a vyšetří na přítomnost patologických, např. nádorových buněk (44).

Odebrat můžeme prakticky jakoukoli tkáň. Odebraný materiál je nutné co nejrychleji dopravit ve sterilní zkumavce do laboratoře k vyšetření. Na žádance je nutné kromě standardních údajů uvést, o jaký materiál se jedná. Nejčastěji se provádí odběr jaterní a ledvinné tkáně, střeva a kostní dřene, tzv. trepanobiopsie. Odběr choriových klků (součást vyvíjející se placenty) se využívá v prenatalní diagnostice. Pro cytogenetické i molekulárně biologické vyšetření tohoto materiálu je nutný odběr do sterilních nádobek s kultivačním médiem (39).

1.2.9. Odběry ostatních biologických materiálů

K materiálům, které ještě stojí za zmínku, patří vlasy, sliny, pot a meconium, využívané často při toxikologických vyšetřeních. Jejich hlavní výhodou je snadný, neinvazivní odběr. Z analytického hlediska je výhodou slin a potu minimální nutná příprava vzorku k analýze. Problémy však nastávají s kvantifikací, neboť se nedá přesně určit, kolik slin a potu konkrétní jedinec za den vyprodukoval. Vlasy, které rostou poměrně dlouhou dobu, nám umožňují získat profil dlouhodobého zneužívání určitých látek, např. drog (38).

V oblasti reprodukční medicíny se provádí odběr ejakulátu, odběr vajíček (folikulů), případně odběr mateřského mléka.

1.3. Transport vzorků do laboratoře

Transport odebraného vzorku biologického materiálu do laboratoře by měl být co nejrychlejší, šetrný, při vhodných teplotních a světelných podmínkách. Tyto podmínky závisí především na stabilitě stanovovaného analytu, případně na stabilitě ostatních komponent ovlivňujících výsledek laboratorního vyšetření, do jisté míry také na typu biologické matrice (3, 29).

Ať už se jedná o jakýkoli biologický materiál, je potřeba, aby byl transportován ve vhodné, uzavřené a řádně označené odběrové nádobce, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku, případně k jeho záměně. Během transportu existuje vysoké riziko vzniku preanalytické chyby, proto je nutné během přepravy dodržovat předepsané podmínky pro vyšetřovaný analyt, zejména dobu a teplotní podmínky. V případě, že je vzorek

transportován do laboratoře neprodleně po odběru, postačuje pro většinu analytů i biologických materiálů transport při laboratorní teplotě (5, 6, 13).

Pro příklad se v této kapitole zaměřím na podmínky transportu vzorku krve, jakožto nejčastěji odebíraného biologického materiálu. Krev se transportuje v uzavřených, řádně označených zkumavkách (dříve skleněných, dnes většinou plastových), uzavřených gumovou zátkou. Pro většinu laboratorních vyšetření přepravujeme vzorky krve při laboratorní teplotě. Při vysoké teplotě transportu vzorku krve dochází k poklesu aktivity až k inaktivaci některých enzymů a rychleji klesá koncentrace glukózy, naopak nízká teplota může způsobit hemolýzu erytrocytů. Přesto se krev pro některá vyšetření transportuje na tajícím ledu (např. k vyšetření acidobazické rovnováhy, stanovení amoniaku, či laktátu), nebo při teplotě 4 °C (při stanovení kyseliny fosfátové či homocysteinu). Vystavení krve světlu způsobuje degradaci některých analytů, např. bilirubinu či některých vitamínů (4).

Používá-li se k vyšetření plazma nebo sérum a není-li možné provést vyšetření ihned, je vhodné v rámci stability analytů krev zcentrifugovat a oddělit plazmu, resp. sérum od krvinek do označené sterilní odběrové nádoby a tu pak transportovat do laboratoře. K dosažení delší stability je vhodné staženou plazmu resp. sérum zamrazit a přepravovat ji zamraženou na ledu. Zamražený materiál však nesmí během transportu roztát. Při odběru srážlivé krve je nejlepší nechat stát zkumavky cca 5 – 10 minut před transportem ve stojánku, aby došlo k úplnému sražení krve, jinak hrozí vysoké riziko hemolýzy (20).

1.4. Uchovávání vzorků před analýzou

Podmínky uchovávání vzorků před analýzou mají stejně jako jejich transport výrazný vliv na stabilitu analytů, resp. na výsledek vyšetření. Největší vliv na stabilitu analytů má teplota uskladnění vzorku, doba od odběru materiálu do provedení analýzy a u látek fotolabilních je to expozice světla (3, 4, 5, 6, 13).

Podmínky krátkodobého skladování mohou být srovnatelné s podmínkami transportu. Pro dlouhodobé skladování je však nezbytné, aby byl materiál dobře uzavřen, aby bylo zabráněno zahuštění vzorku odpařováním, mikrobiální kontaminaci, vlivu světla a difuzi plynů. U krve musí být samozřejmě zabráněno metabolismu krevních elementů, čehož se dosahuje centrifugací s následným oddělením séra či plazmy do sterilní uzavíratelné zkumavky. Plazmu i některé další biologické materiály je pro dlouhodobé skladování nutné zamrazit alespoň na -20 °C, lépe však na -80 °C.

Materiál může být zamražen a rozmražen pouze jednou. Některá speciální vyšetření se provádějí pouze v sériích, takže bez zamražení vzorků by bylo vyšetření prakticky nemožné. Naopak některá vyšetření lze provést pouze bezprostředně po odběru z čerstvého materiálu, poněvadž každá časová prodleva by výrazně ovlivnila výsledek vyšetření (19, 20).

1.5. Prvotní zpracování a příprava vzorku k analýze

V klinických laboratořích, kde se vyšetřují zpravidla velké počty vzorků, se provádí pouze jednoduchá a časově nenáročná příprava vzorků. Navíc se jedná o proces, který lze většinou snadno automatizovat. Patří sem např. homogenizace (promíchání) vzorku na valivé míchačce, centrifugace krve s případným oddělením séra či plazmy, deproteinace vzorku, zahuštění či naopak naředění vzorku, vzácněji např. promývání erytrocytů ad. Kromě rychlosti a jednoduchosti těchto technik se klade důraz na minimální riziko vzniku chyby a tím ovlivnění výsledku vyšetření. Při tomto zpracování vzorků je nutné v první řadě správné označení použitých zkumavek, aby nedošlo k záměně vzorků v laboratoři. I přes jednoduchost používaných technik přípravy vzorku mohou nastat některé další chyby, např. hemolýza erytrocytů způsobená příliš vysokou rychlostí otáček během centrifugace, znehodnocení vzorku nesprávným výběrem deproteinačního činidla, ztráty analytů během extrakce z důvodu špatně zvolených podmínek či nechtěné rozlití vzorku a tím pádem jeho znehodnocení (4).

2. Techniky přípravy vzorku biologického materiálu k analýze

Moderní instrumentální analytické metody zpravidla vyžadují předchozí přípravu vzorku, během které dochází k izolaci a zakoncentrování stanovovaných analytů. Tato příprava vzorků k analýze bývá často časově nejnáročnějším a nejkritičtějším krokem celé analýzy, zejména v případě vzorků biologických materiálů. Na způsobu provedení této fáze závisí celkový úspěch analytického stanovení, jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Volbou vhodné techniky přípravy vzorku se tedy rozhoduje nejen o přesnosti stanovení daného analytu, ale vůbec o možnosti jeho určení. Při analýze biologických maticí je téměř nevyhnutelné použití

některé z technik přípravy vzorku, v mnoha případech jich musí být použito i několik (45).

Variabilita vzorků biologických materiálů je obrovská – od kapalných jako jsou krev, plazma, sérum, moč, sliny, mozkomíšni mok a další, přes vazké jako např. sputum až po pevné jako jsou biopsie různých orgánů, stolice či vlasy. Jednou ze společných vlastností všech biologických materiálů je vysoký obsah různých endogenních látek působících rušivě na analýzu většinou nízkých koncentrací sledovaných látek a jejich metabolitů. Proto je nutné provést nejdříve izolaci analytů a odstranit endogenní látky, aby došlo ke zvýšení selektivity a citlivosti metody stanovení.

Výběr vhodné techniky přípravy vzorku záleží především na druhu biologického materiálu, na chemické struktuře stanovovaných látek, na jejich fyzikálně chemických vlastnostech, ale také na tom, zda má být materiál výchozí surovinou pro izolaci a detekci látky či skupiny látek nebo zda chceme studovat metabolismus těchto látek. Technika přípravy vzorku je tím snazší, čím více je materiál tekutý a složkově jednoduchý. V tomto směru můžeme materiály seřadit dle vhodnosti pro analytické separační techniky v následujícím pořadí: mozkomíšni mok, slzy, pot, sliny, moč, žluč, plazma, sérum, krev, stolice, biopsie tkání (38).

Stejně tak jako je různorodý odebíraný biologický materiál, jsou také využívány techniky přípravy vzorku před analýzou různé. Odlišné bývají také metody přípravy vzorku v různých klinických oborech. Tak například pro rutinní hematologická či biochemická vyšetření z plné krve stačí vzorek před analýzou promíchat (zhomogenizovat), v případě, že k vyšetření potřebujeme plazmu nebo sérum, tak zcentrifugovat. Složitější přípravu vzorku k analýze vyžaduje molekulární biologie, kde je nutné vyizolovat nukleovou kyselinu DNA případně RNA. K tomu je třeba provést nejprve lýzu buněk, nejčastěji chemickou lýzu detergentem s následnou extrakcí nukleové kyseliny ve speciální extrakční kolonce. Lýzu buněk je nutné provést také v případech, kdy stanovujeme látky obsažené v buňkách nebo krevních elementech, např. v erytrocytech či trombocytech. Nejsložitější příprava vzorku je pro toxikologii a instrumentální analýzu ke stanovení velice nízkých koncentrací analytů ve složitých komplexních maticích s velkým obsahem balastních látek, působících na analýzu rušivě (8, 38).

Obecně lze říci, že u nejběžnějších rutinních vyšetření, kterých se dělají v klinických laboratořích stovky denně, je příprava vzorku k analýze nejjednodušší. To je případ právě hematologie či biochemie, kde si vystačíme s homogenizací,

centrifugací, případně filtrací či naředěním vzorku. Čím je vyšetření speciálnější, tím zpravidla vyžaduje i vyšší nároky na přípravu vzorku před analýzou.

V této kapitole budou krátce zmíněny jednoduché techniky přípravy vzorku biologického materiálu k analýze, využívané v klinických laboratořích a předcházející rutinním laboratorním vyšetřením. Jedná se o jednoduché techniky jako je homogenizace, ultrafiltrace, centrifugace a další. Nejpodstatnější část této kapitoly bude však zaměřena na moderní extrakční metody a on-line techniky přípravy vzorku biologického materiálu přímo v analytickém systému.

2.1. Homogenizace

Nutnou podmínkou dosažení srovnatelných analytických výsledků je homogenní vzorek. Vzorky biologického materiálu jako biopsie orgánů, vzorky solidních tumorů či svalová tkáň jsou vzorky značně nehomogenní, navíc pevné, které není možné bez předchozí homogenizace analyzovat. Homogenizace je postup, při kterém se z nestejnorodého vzorku (heterogenního) připraví dokonalým rozmělněním vzorek jednotný a stejnorodý (homogenní). Je to tedy důkladné mechanické rozmělnění materiálu za přídavku vody nebo vhodných pufrů či fyziologických roztoků. Jedná se zpravidla o první krok zpracování biologického materiálu.

Pro homogenizaci malých množství vzorku je nejvhodnější ruční roztírání materiálu ve třecí misce s tloučkem nebo tyčinkou ve zkumavce. Jinak se homogenizace běžně provádí v laboratorních homogenizátorech nebo ve výkonném mixéru. Tužší materiály je možné před homogenizací zmrazit kapalným dusíkem, který je učiní křehčími k rozmělnění. V některých případech lze využít opakované zamrazování a rozmrazování, působení chemických činidel, enzymů nebo ultrazvuku. V těchto případech však často dochází až k tzv. dezintegraci buněk, tedy narušení buněčné stěny (46).

Homogenizace se však netýká pouze vzorků pevných biologických materiálů, je potřeba ji provádět i u některých tekutých vzorků, například u plné krve. Jedná se o suspenzi krevních elementů o různé velikosti a s různou rychlostí sedimentace. V případě vyšetření krevního obrazu, kdy se měří četnost jednotlivých krevních elementů, je nezbytné, aby byla suspenze dokonale homogenní. Proto je nutné krev před vyšetřením dokonale promíchat na valivé míchačce (20).

2.2. Deproteinace

Přítomnost proteinů působí u velkého množství analytických stanovení rušivě. Zvláště při stanovení hladin léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách, zejména v plazmě, séru či plné krvi instrumentálními analytickými metodami, musíme vzorek dokonale zbavit veškerých proteinů a dalších makromolekulárních látek. Přítomnost těchto balastních látek nejenže působí rušivě na stanovení analytů, ale může také nevratně poškodit některé části instrumentace, zejména chromatografickou kolonu.

Při deproteinaci by měly být odstraněny všechny proteiny, i ty o malé molekulové hmotnosti. Precipitát by neměl adsorbovat na svůj povrch sledované látky. Deproteinační činidlo nesmí reagovat se sledovanou látkou ani interferovat při detekci či jinak ovlivňovat analytickou výtěžnost. Při volbě deproteinační techniky se musí vzít v úvahu chemické složení analyzované látky, její stabilita, vazba na proteiny, ale také výtěžek látek po precipitaci (38).

Mezi nejčastěji používané deproteinační techniky patří ultrafiltrace a dialýza, enzymové deproteinace a precipitační metody.

2.2.1. Ultrafiltrace

Ultrafiltrace se stejně jako dialýza používá k separaci či zakoncentrování látek s molekulovou hmotností větší než 10^4 . Během tohoto procesu procházejí rozpouštědlo a rozpuštěné látky až do určité kritické velikosti přes membránu na základě tlakového gradientu. Rozhodujícím faktorem ultrafiltrace je velikost pórů membrány. Při ultrafiltraci se využívá buď pozitivní nebo negativní tlak. Pozitivního tlaku se dosahuje inertním plynem, nejčastěji dusíkem, nad filtrovaným roztokem. Roztoky se filtrují pod tlakem 0,05 až 0,5 MPa anebo také působením odstředivé síly v centrifuze. Naopak negativní tlak se vytváří pomocí vakua v prostoru již přefiltrovaného roztoku (46).

Rozpouštědlo a rozpuštěné látky o menší velikosti než je velikost pórů v membráně procházejí do ultrafiltrátu. Naopak látky větší, o větší molekulové hmotnosti, se nad membránou postupně koncentrují. V případě, že je ultrafiltrace použita ke sledování látek větších, než je velikost pórů membrány, může se zadržet retentát promýt čistým rozpouštědlem, čímž se sníží podíl balastních nízkomolekulárních látek v retentátu. Takto je ultrafiltrace využita např. k purifikaci proteinů od anorganických solí či k frakcionaci bílkovin (47). Ultrafiltrace však může být využita i obráceně, k izolaci nízkomolekulárních látek o malé velikosti, např. léčiv a jejich metabolitů, které projdou

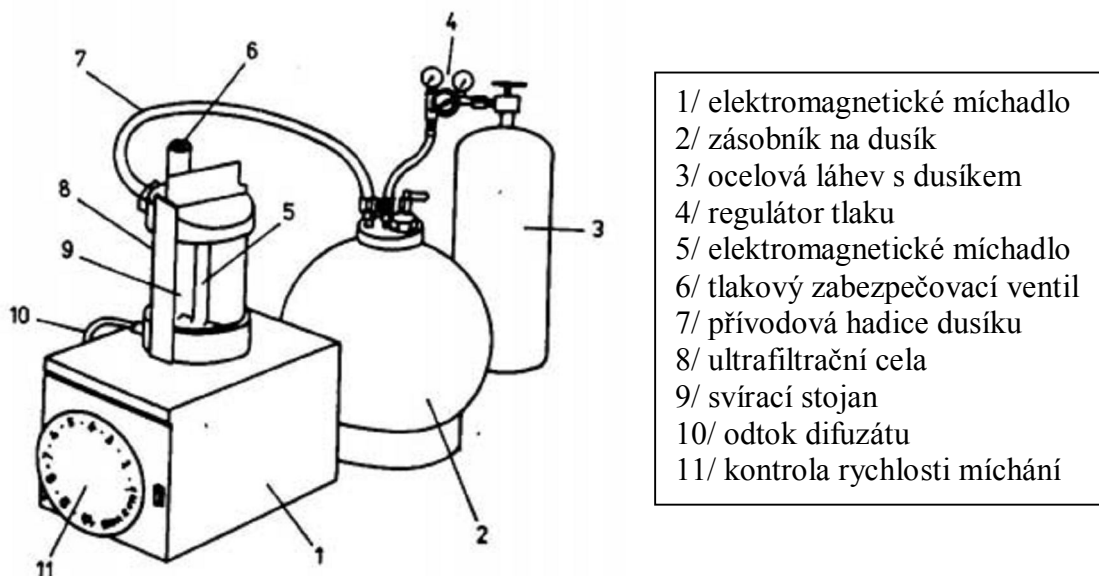
membránou filtru, čímž se oddělí od makromolekulárních balastních látek, nejčastěji proteinů, které se zachytí na filtru. Výhodou této techniky je fakt, že nedochází ke změně koncentrace analyzovaných nízkomolekulárních analytů naředěním, nemění se pH, nedojde ke kontaminaci vzorku promývacím roztokem či deproteinačním činidlem. Účinnost této metody dosahuje až 99 % (45, 46, 48).

K hlavním požadavkům na membránové filtry patří dostatečná rychlost propouštění rozpouštědel a nízkomolekulárních látek a standardní rozměr pórů. Tyto podmínky nejlépe splňují membránové filtry zhotovené z anizotropních polymerů s tloušťkou stěny obvykle 0,1 – 1,5 μm , připevněné na podpůrný materiál podobného chemického složení, ale s podstatně většími póry. V současné době jsou komerčně dostupné membránové filtry s průměrem pórů od 0,1 do 50 nm, které umožňují dělit látky s relativními molekulovými hmotnostmi od 500 do 300000 Da. Jsou odolné vůči různým organickým rozpouštědlům, zředěným kyselinám, hydroxidům a oxidačním látkám, lze s nimi pracovat do teploty až 200 °C. Při správném zacházení se mohou používat mnohonásobněkrát za sebou. Jen je třeba zajistit, aby se zadržované molekuly nehromadily na povrchu filtru a nezacpávaly jeho póry, čehož se dosahuje nejčastěji kontinuálním mícháním nebo probubláváním (46).

Mezi hlavní výhody ultrafiltrace, jakožto běžně používané techniky k zakoncentrování látek či dělení roztoků pomocí membránových filtrů na základě rozdílné relativní molekulové hmotnosti, patří jednoduchost, rychlost a nízká cena provedení. Určitým omezením této metody je nízké rozlišení. Pro dosažení vyšší selektivity při zachování vysokých objemových kapacit byla ultrafiltrace spojena s afinitními interakcemi do jediné metody, tzv. afinitní ultrafiltrace. Nevýhodou této techniky při izolaci nízkomolekulárních látek je možnost jejich vazby na makromolekuly, např. vazba léčiv na plazmatické proteiny, čímž dojde k jejich zadržení v retentátu spolu s makromolekulami. Ultrafiltrát pak obsahuje pouze volnou frakci nízkomolekulárních látek, nenávanou na proteiny (46).

V současné době se s výhodou používají k deproteinaci malých objemů vzorků biologických materiálů speciální komerčně dostupné centrifugační ultrafiltrační zkumavky. V těchto zkumavkách je již zabudovaná filtrační membrána. Vzorek biologického materiálu se nanese do zkumavky, poté se zkumavka vloží do centrifugy. Během centrifugace dojde k separaci látek na základě velikosti pórů filtrační membrány. Látky větší, než je velikost pórů membrány, zůstanou zadrženy nad

membránou, zatímco malé molekuly projdou membránou a zůstanou v ultrafiltrátu na dně zkumavky (46, 49).



- | | |
|-----|------------------------------|
| 1/ | elektromagnetické míchadlo |
| 2/ | zásobník na dusík |
| 3/ | ocelová láhev s dusíkem |
| 4/ | regulátor tlaku |
| 5/ | elektromagnetické míchadlo |
| 6/ | tlakový zabezpečovací ventil |
| 7/ | přívodová hadice dusíku |
| 8/ | ultrafiltrační cela |
| 9/ | svírací stojan |
| 10/ | odtok difuzátu |
| 11/ | kontrola rychlosti míchání |

Obr. 10 Schéma zařízení pro ultrafiltraci (46)

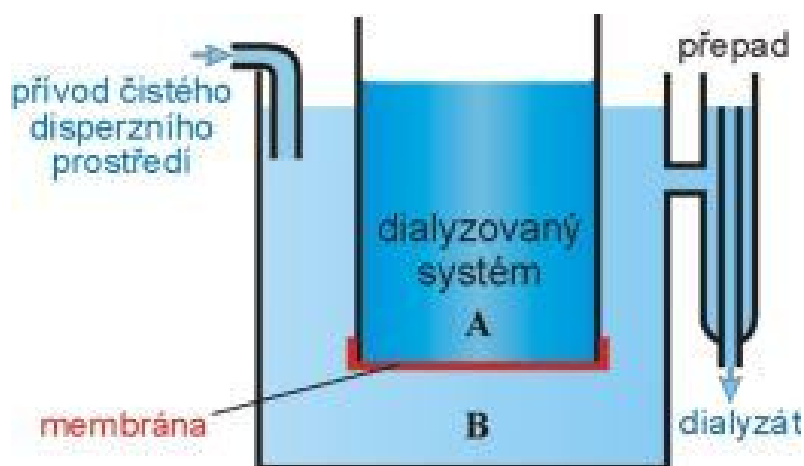
2.2.2. Dialýza

Dialýza se často řadí mezi membránové extrakční techniky. Jelikož je však cílem práce zahrnout do kapitoly extrakčních technik zejména moderní metody, mezi které dialýza nepatří, byla zařazena do této kapitoly deproteinačních technik.

Tato separační technika využívá prostupu nízkomolekulárních látek membránou nepropustnou pro velké molekuly z roztoku o vyšší koncentraci do roztoku o koncentraci nižší. Tento děj probíhá do okamžiku, kdy se koncentrace procházejících látek na obou stranách membrány vyrovnají. Dělení látek tedy probíhá na základě jejich rozdílné velikosti a rozpustnosti, neboť přechod přes tzv. polopropustnou membránu je umožněn pouze analyticky disperzním látkám a ještě pouze po koncentračním spádu. Makromolekuly, např. proteiny neprojdou pro svou velikost póry dialyzační membrány (46).

Dialýza se používá nejčastěji tam, kde je potřeba zbavit vysokomolekulární látky nízkomolekulárních nečistot, umožňuje např. snadné oddělení solí od roztoků proteinů, tzv. vysolování proteinů, uplatňuje se i při krystalizaci proteinů. Je však možné ji použít i v opačných případech, kdy je třeba oddělit a získat nízkomolekulární látky a odstranit vysokomolekulární nečistoty (48).

Zatímco se dříve používaly pro dialýzu různé membrány typu kolodium, celofán, pergamen anebo i membrány zvířecího původu (střeva, vaječná blanka, různé měchýře ad.), v současné době jsou komerčně dostupné umělé membrány s vhodnou velikostí pórů, ve tvaru dlouhé trubice různého průměru. Potřebný kus dialyzační trubice se odstříhne a na jednom konci pevně zaváže nebo uzavře speciální svorkou. Před prvním použitím je třeba novou trubicí vždy pořádně propláchnout destilovanou vodou, aby se vymyl glycerol, kterým je trubice impregnována. Po naplnění této trubice vzorkem se uzavře i její druhý konec a vloží se do nádoby s vodou nebo pufrům o nízké iontové síle. Snahou je dosažení co nejvyšší rychlosti dialýzy. Ta závisí na koncentračním spádu, zpočátku je rychlejší, postupně se zpomaluje tím, jak se vyrovnávají koncentrace látek na obou stranách membrány. Dále rychlost procesu závisí na teplotě, na počtu a velikosti pórů v membráně, na síle membrány, na elektrických interakcích mezi membránou a difundujícími částicemi a na velikosti plochy membrány. Míchání a obvykle i výměna kapaliny, tzv. dialyzátu, proces velmi urychlují. Přesto trvá dialýza zpravidla desítky hodin. Obvykle se provádí přes noc při teplotě 0 – 4 °C, aby se zabránilo denaturaci proteinů a množení mikroorganismů (46, 48).



Obr. 11 Schéma dialyzátoru (50)

V současné době existuje několik modifikací dialýzy, např. elektrodialýza, kde se aplikuje na iontově výměnnou membránu napětí, které na ní způsobí pozitivní nebo negativní náboj. Výsledkem je pak selektivní pohyb kationtů nebo aniontů do zóny koncentrace v závislosti na aplikovaném proudu. Velkou nevýhodou elektrodialýzy je ovšem fakt, že přestup přes membránu je umožněn pouze pro elektrolyty. Proto se s výhodou kombinuje elektrodialýza s ultrafiltrací, čímž vzniká tzv. elektroultrafiltrace, při které procházejí přes membránu nejenom elektrolyty, ale i neelektrolyty. Další

modifikací dialýzy je tzv. mikrodialýza, která je vhodná zejména pro malé objemy vzorků a kterou lze snadno automatizovat. Provádí se pomocí dialyzačního vlákna či fólie. Možné jsou také kombinace mikrodialýzy s různými technikami přípravy vzorku, např. se SPE (45).

2.2.3. Precipitační techniky

Precipitační techniky je možné využít v rámci přípravy vzorku biologického materiálu k analýze dvěma způsoby. Buď ke kvantitativnímu oddělení makromolekul z roztoku, tzv. deproteinaci, nebo naopak k izolaci makromolekul, tzv. frakcionaci. V instrumentální analýze se častěji využívají deproteinační techniky ve smyslu odstranění (vysrážení) makromolekul, nejčastěji proteinů, protože jejich přítomnost ve vzorku působí na stanovení rušivě a často dokonce zcela znemožňuje použití dané techniky stanovení.

Precipitace proteinů vhodnými deproteinačními činidly je nejjednodušší metodou úpravy vzorku před analýzou. Po přidání deproteinačního činidla a následné centrifugaci je alikvot supernatantu přímo použit k analýze nebo je odpařen do sucha. Odparek je poté rozpuštěn v minimálním objemu mobilní fáze nebo její součásti a analyzován.

Precipitace může být provedena několika způsoby. Buď přidavkem silných anorganických či organických kyselin ke vzorku (např. kyseliny trifluoroctové, pikrové, trichloroctové, chloristé, mravenčí, chlorovodíkové, metafosforečné ad.). Nevýhodou zde je silně kyselý supernatant, který může způsobit rozložení analytu. Druhou možností je přidavek organického rozpouštědla mísitelného s vodou, nejčastěji methanolu, ethanolu, acetonitrilu, tetrahydrofuranu, acetonu ad., velice často se využívají směsi výše uvedených rozpouštědel. Třetím způsobem precipitace je přidání iontů těžkých kovů, např. Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , či Ba^{2+} . Tento postup ovšem není vhodný pro analyty, které snadno vytvářejí komplexy s ionty těžkých kovů. Precipitaci lze taktéž vyvolat saturací materiálu solí, nejčastěji síranem amonným, nevýhodou je však vysoká koncentrace této soli v supernatantu. V praxi se často využívá kombinace několika výše uvedených deproteinačních činidel, nebo se provádí zahřívání vzorku na teplotu až 100 °C po dobu 5 – 10 minut. Tato metoda však není příliš účinná a navíc může způsobit rozklad analytů. Vždy je potřeba optimalizovat podmínky precipitační techniky tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší výtěžnosti analyzovaných látek a maximálnímu odstranění rušivé matrice vzorku (46, 48, 51).

Druhým případem využití precipitačních technik je počáteční izolace makromolekul, hlavně proteinů a nukleových kyselin, tzv. frakcionace. Zde se samozřejmě používají méně drastické podmínky srážení, neboť potřebujeme získat makromolekuly nepoškozené. Nejčastěji se provádí frakcionace organickými rozpouštědly, kyselinami či zásadami, dále změnami koncentrace solí, pH, teploty nebo jejich kombinacemi. V současné době lze využít také vysoce selektivní imunoprecipitace, kdy mohou být antigeny precipitovány použitím odpovídajících protilátek (51, 52).

Precipitační technika byla později poloautomatizována (53), v dalších letech pak dokonce plně automatizována. Ma a kol. (54) představili plně automatizovanou precipitační techniku v 96 jamkovém formátu použitou ve spojení s HPLC-MS/MS. Obdobný formát této techniky byl použit k přípravě vzorku plazmy při stanovení klarithromycinu (55) či fudosteinu (56).

Tab. 4 Výhody a nevýhody základních deproteinačních technik (57)

POROVNÁNÍ VÝHOD A NEVÝHOD MEZI MIKRODIALÝZOU, ULTRAFILTRACÍ A PRECIPITACÍ K ODSTRANĚNÍ BÍLKOVIN

Metoda	Výhody	Nevýhody
Microdialýza	Možnost in-vivo vzorkování a plně automatizovaná on-line příprava vzorku	Vazba analytu na membránu Pomalé zpracování Nízký výtěžek
Ultrafiltrace	Rychlá obzvláště při použití dutých vláken Možnost zacházení s malými objemy vzorku Mírné chemické prostředí	Vazba analytu na membránu
Precipitace	Široká možnost výběru precipitačních podmínek	Velký objem vzorku Vyžaduje extrémní pH nebo vysokou iontovou sílu

2.3. Centrifugace, ultracentrifugace

Centrifugace neboli odstředování je jednoduchá základní laboratorní metoda, která umožňuje oddělit složky suspenze či emulze na základě jejich rozdílných hustot. Samovolná sedimentace pevných částic způsobená gravitací je použitím centrifugy

výrazně urychlena. Centrifugace je často rychlejší a pohodlnější než filtrace a v některých případech vede i k lepšímu oddělení pevné a kapalné fáze, zvláště v případech, kdy je vzorek špatně filtrovatelný a filtrace zdlouhavá (46).

V praxi se centrifugace většinou používá k dělení směsí kapalin, odstranění sraženin, izolaci nebo odstranění buněk, oddělení plazmy či séra od krevních elementů nebo k frakcionaci makromolekul podle hustoty. Mimoto se může použít ke speciálním preparativním či analytickým účelům, např. k izolaci buněčných organel, přípravě buněčných struktur, či stanovení relativních molekulových hmotností sloučenin a čistoty izolovaných preparátů (51).

Během centrifugace se zkumavky pohybují v tzv. rotoru po kruhové dráze, kde na ně působí odstředivá síla, která je tím větší, čím větší rychlostí a po delší dráze se zkumavky pohybují. Tato síla F tedy závisí na poloměru rotoru a na rychlosti, se kterou se rotor otáčí. Lze ji vypočítat ze vztahu $F = m \cdot r \cdot \omega^2$, kde m je hmotnost částice, r je poloměr otáčení a ω je úhlová rychlost ($\omega = 2\pi \cdot f$, kde f je frekvence otáček). Pro praktické výpočty se však zavádí veličina relativní centrifugační síla (RCF), která udává, kolikrát se při odstředování znásobí hmotnost částic, resp. kolikrát je zrychlení centrifugy větší než tíhové zrychlení g . Je dána vztahem $RCF = r \cdot \omega^2 / g$, snadno se vypočítá pro kteroukoli centrifugu a daný počet otáček: $RCF = 1,118 \cdot r \cdot N^2 \cdot 10^{-5}$, kde N je počet otáček za minutu a r je poloměr otáčení v cm. Udává se v násobcích g , je bezrozměrná a uvádí se jako hlavní charakteristika centrifugace (46, 58).

Existují různé typy centrifug, které se liší velikostí (od malých stolních až po velkoobjemové průmyslové odstředivky), frekvencí otáček (nízko-, středně- a vysokoobrátkové, tzv. ultracentrifugy), možností chlazení vzorků (nechlazené, chlazené a s možností mrazení) a tvarem rotorů (výkyvné a úhlové). Centrifugy s tzv. výkyvnými rotory umožňují vychýlení nosiče zkumavek podle intenzity odstředivé síly až do horizontální polohy. Jejich výhodou je, že odstředivá síla působí kolmo ke dnu zkumavky, naopak nevýhodou je omezená mechanická odolnost čepů, na kterých dochází k vychýlení nosiče zkumavek, takže lze dosáhnout obvykle RCF jen kolem 5000 g . Takové odstředování je vhodné především pro sedimentaci buněk a jiných větších a těžších částic. Běžné laboratorní centrifugy s pevnými tzv. úhlovými rotory dosahují RCF mezi 10-30 000 g , která zcela postačuje pro rychlou sedimentaci např. sražených molekul DNA. Odstředivá síla v nich působí šikmo, takže je i sediment na dně zkumavky po centrifugaci zešikmený. Pro speciální techniky se používají tzv.

ultracentrifugy, které dosahují RCF 80 000 g i více. Podmínkou těchto centrifug je uložení rotoru ve vakuu, čímž se sníží odpor vzduchu a tím vyvolaný vznik tepla třením. Používají se pro dělení biopolymerů a subcelulárních částic, často v hustotním gradientu např. sacharózy nebo cesných solí. Tyto techniky se provádějí jak za účelem analytickým, tak i preparativním. Analytické centrifugy jsou navíc opatřeny optickým zařízením, které umožňuje sledovat rozhraní tvořená jednotlivými sedimentujícími látkami (51, 58).

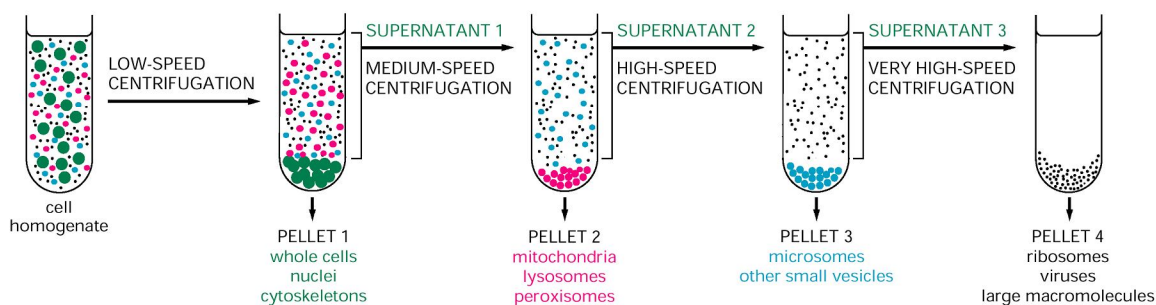
Technika centrifugace je velice citlivá na vyvážení rotoru. Zvláště u vysokoobrátkových centrifug musí být protilehlé kyvety vyváženy nejen staticky, ale i dynamicky. Každá nepřesnost ve vyvážení se totiž mnohonásobně projeví zvětšením odstředivého tlaku na jednu stranu osy. Osa se pak snadno ohne nebo se poškodí ložisko, při chodu centrifugy se projevují silné vibrace. Statického vyvážení se dosáhne tak, že se na technických váhách s přesností na jeden gram vyváží protilehlá pouzdra s kyvetami naplněnými suspenzí určenou k centrifugaci. Mnohem větší pozornost je třeba věnovat dynamickému vyvážení protilehlých kyvet. Ty musí mít stejnou velikost, hmotnost a stejně umístěné těžiště, což znamená, že musí být naplněny stejnou suspenzí, suspenzí o stejné hustotě (46).

O rychlosti sedimentace vedle relativní centrifugační síly (RCF) dále rozhoduje hlavně rozdíl mezi hustotou centrifugovaných částic a rozpouštědla (zde platí přímá úměra) a faktor tření (nepřímá úměra). Podle způsobu odstředování rozlišujeme tzv. diferenciální centrifugaci a centrifugaci gradientovou, kterou můžeme dále dělit na izopyknickou a zonální (58).

2.3.1. Diferenciální centrifugace

Základem centrifugace jsou rozdíly v sedimentačních rychlostech částic. Centrifugace probíhá v homogenním médiu s podstatně nižší hustotou, než jakou mají sedimentující částice, používá se např. vodný roztok sacharózy o koncentraci 0,25 mol/l. Během tohoto procesu sedimentují různé částice různou rychlostí na základě jejich sedimentačních koeficientů. Sedimentační koeficient závisí na hmotnosti a denzitě částic a na jejich interakci s kapalinou. Nedochází zde k dosažení hustotní rovnováhy. Dělení se provádí tak, aby všechny částice jedné velikosti, tj. se stejným koeficientem sedimentace, zcela sedimentovaly. V praxi se provádí opakovaná centrifugace se zvyšující se rychlostí otáček. Diferenciální centrifugace se používá zejména k odstranění buněk, k oddělení sraženiny a při rozdělení buněčného

homogenátu na částice (resp. při odstranění některých částic z homogenátu). V klinických laboratořích se nejčastěji používá k přípravě plazmy, respektive séra z plné krve. Nastavením vhodných podmínek centrifugace lze získat např. plazmu bohatou, resp. chudou na destičky (51, 58).

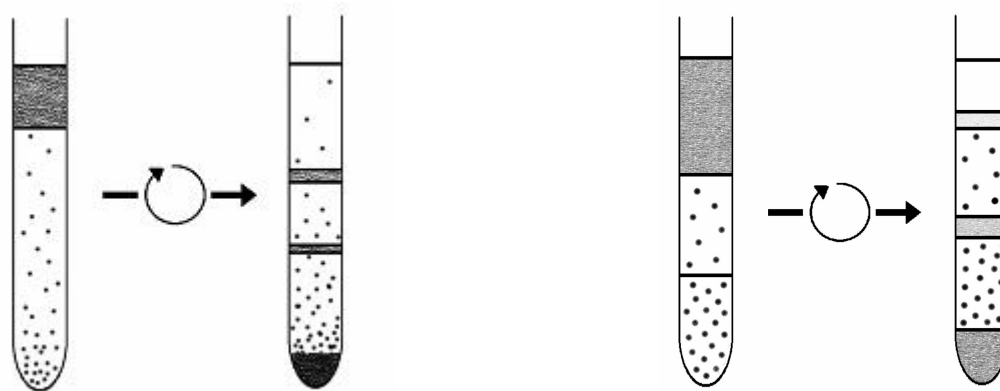


Obr. 12 Diferenciální centrifugace (51)

2.3.2. Gradientová centrifugace (centrifugace v hustotním gradientu)

U tohoto typu centrifugace je nutný správný výběr centrifugačního média, které samozřejmě musí vytvářet gradient, nesmí interferovat se vzorkem a musí být ze vzorku snadno odstranitelné. K tomuto účelu se nejčastěji používá sacharóza, glycerol či Ficoll-dextran, u kterých se musí gradient připravit anebo soli CsCl, Cs₂SO₄ či NaBr, které vytvářejí gradient během centrifugace samy (51, 58).

Existují dva typy hustotních gradientů – diskontinuální a kontinuální. Diskontinuální (nespojité, skokový) gradient je tvořen několika vrstvami o různé hustotě. U kontinuálního (spojitého, plynulého) gradientu je změna hustoty postupná v celém rozsahu zkumavky (60).

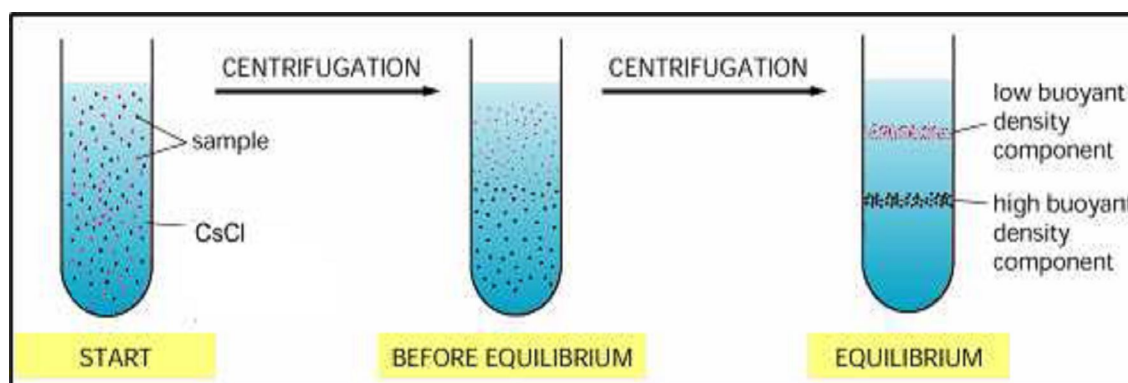


Obr. 13 Kontinuální (vlevo) a diskontinuální hustotní gradient (vpravo) – oba případy před a po centrifugaci (60)

Pro centrifugaci v hustotním gradientu se s výhodou používají speciální tzv. zonální rotory, umožňující centrifugaci velkých objemů materiálu. Plnění i vyprazdňování rotoru může probíhat během jeho otáčení, čímž se zabraňuje promíchání gradientu. Gradientovou centrifugaci lze rozdělit na izopyknickou a zonální (58).

2.3.2.1. Izopyknická gradientová centrifugace

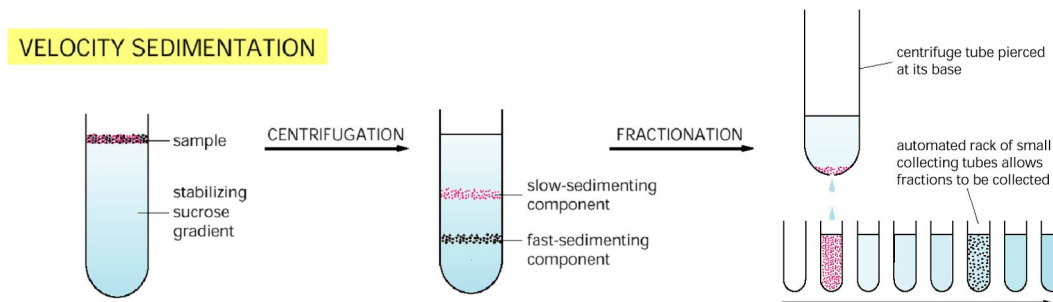
Při tomto typu centrifugace probíhá separace na základě různých hustot částic, nezávisle na jejich vlastnostech jako je velikost nebo molekulová hmotnost. Molekuly jsou separovány až do dosažení rovnovážného stavu, nikoli podle rychlosti sedimentace. Vzorek je rozptýlen v médiu s hustotním gradientem, přičemž rozsah hustot leží v oblasti očekávaných hustot dělených částic. Hustota média roste od horního okraje centrifugační zkumavky směrem ke dnu. Během centrifugace sedimentují částice právě do místa, kde se jejich hustota shoduje s hustotou média (tzv. izopyknický bod). Doba trvání tohoto typu centrifugace bývá dlouhá, např. 30 hodin i déle. K přípravě hustotního gradientu se zde nejčastěji používají solné roztoky, např. CsCl (51, 58).



Obr. 14 Izopyknická gradientová centrifugace (51)

2.3.2.2. Zonální (zónová) gradientová centrifugace

Při zónové centrifugaci se částice dělí podle svých sedimentačních koeficientů na základě tvaru a molekulové hmotnosti. Vzorek je opatrně v kvytě navrstven na hustotní gradient, jehož účelem je zamezit konvekčnímu míchání roztoku. Gradient je tvořen nejčastěji roztokem sacharózy (5-20 %). Během centrifugace se každý typ molekul pohybuje gradientem rychlostí převážně závislou na sedimentačním koeficientu, tedy přímo úměrnou molekulové hmotnosti, takže se vytvářejí zóny jednotlivých látek, které mohou být poté snadno odděleny (51, 58).



Obr. 15 Zonální gradientová centrifugace (51)

2.4. Přímý nástřik

Ve velmi omezené míře lze při analýze biologického materiálu použít přímý nástřik vzorku do separačního systému bez předchozí úpravy. Tato technika je použitelná pouze pro tekuté vzorky s minimálním obsahem balastních látek, zejména proteinů. Přímým nástřikem lze stanovit pouze látku o vysoké koncentraci, aby způsobila výrazně větší odezvu detektoru než průchod balastních látek. Vlnová délka pro detekci musí být zvolena tak, aby docházelo k minimální interferenci balastu (45).

Použití techniky přímého nástřiku v analýze tělních tekutin je velice omezené. Přímou lze do chromatografického systému nadávkovat pouze tekutiny s malým obsahem zejména proteinů a lipidů, jako jsou např. pot, slzy, mozkomíšni mok, ad. I tyto materiály však obsahují velké množství balastních látek, což vede ke zkrácení životnosti chromatografických kolon a také k nízké citlivosti a selektivitě dané metody (38).

Tělní tekutiny s vysokým obsahem endogenních látek, zejména krev, plazmu či sérum, nelze na analytickou kolonu bez předchozí úpravy nadávkovat, zejména kvůli vysokému obsahu proteinů, které by se naadsorbovaly na povrch sorbentu, kolonu by ucpaly a následným protékáním organické mobilní fáze by v ní navíc zdenaturovaly, čímž by ji nenávratně poškodily.

Tyto biologické materiály s vysokým obsahem proteinů lze dávkovat přímo do chromatografického systému bez předchozí úpravy pouze v případě on-line zapojení speciálních extrakčních předkolon plněných tzv. materiály s omezeným přístupem (RAM) (viz kapitola 2.6.2.10.) nebo tzv. materiály s velkými částicemi (LPS) (viz kapitola 2.6.2.9.), které umožňují on-line extrakci přímo v chromatografickém systému, do kterého jsou zapojeny přes vícecestný přepínací ventil, technikou přepínání kolon (CSW) (viz kapitola 2.6.4.).

Použité extrakční předkolony byly speciálně vyvinuty pro on-line extrakci v chromatografickém systému a jsou upraveny k opakovanému přímému nástřiku neupravených tělních tekutin. Dochází na nich k zadržení stanovovaných analytů, zatímco balastní látky jsou vymyty do odpadu promývací mobilní fází. Po přepnutí přepínacího ventilu jsou zadržené analyty analytickou mobilní fází přeneseny na analytickou kolonu, kde jsou separovány a následně zaznamenány v detektoru.

Ve všech ostatních případech musí vzorky tělních tekutin s vysokým obsahem endogenních látek projít předchozí (off-line) přípravou k analýze a teprve poté mohou být nadávkovány do separačního zařízení.

2.5. Derivatizace

Derivatizační techniky patří mezi analytické metody, které využívají specifické chemické reakce k tvorbě detekovatelných derivátů, zvýšení citlivosti a/nebo selektivity, zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec, např. zvýšením těkavosti látek nebo připojením funkčních skupin. Smyslem je docílit kvalitativně nových vlastností stanovovaných analytů, které umožní předseparaci či vlastní separaci, usnadní identifikaci, či zvýší citlivost detekce (61).

Každá z chromatografických technik klade na připravené deriváty jiné požadavky. U plynové chromatografie je třeba docílit toho, aby vznikající deriváty byly těkavější než látky původní, zatímco v kapalinové chromatografii v plošném uspořádání je tomu naopak. U kapalinové kolonové chromatografie nehraje tenze par separovaných složek významnou roli, ale jde především o vyvolání změn v rozpustnosti jednotlivých analytů obsažených ve směsi. Derivatizace má totiž vliv na eluční charakteristiky separovaných látek, zejména na účinnost separace a dobu analýzy (62).

Derivatizace můžeme rozdělit podle místa derivatizační reakce na předkolonové (pre-column chromatography), u kterých probíhá chemická reakce ještě před vstupem na kolonu; postkolonové derivatizace (post-column chromatography), kde chemická reakce probíhá až za kolonou, před vstupem do detektoru a derivatizace na koloně (63).

Poměrně novinkou je derivatizace probíhající během extrakce. Nejvíce byla dosud prostudována derivatizace na extrakčním vlákně a to před, během nebo po sorpci na jeho povrch, viz kapitola 2.6.2.2.1. (64). Autoři Stashenko a Martínez (65) publikovali review zabývající se derivatizací v kombinaci se SPME.

Přestože již bylo publikováno mnoho prací, zabývajících se touto problematikou (např. 66-68), v rutinní analýze je používáno pouze několik derivatizačních reakcí. V praxi se jedná o další krok navíc, další riziko vnesení chyby, proto se dnes preferují metody přímé a bez derivatizace.

2.6. Extrakce

Extrakční techniky zaujímají první místo ve využití mezi technikami přípravy vzorků k analýze. Je to dáno schopností sledovaný analyt ze vzorku izolovat, vyčistit a zakoncentrovat do malého objemu organického rozpouštědla v jednom kroku. Velkou část extrakčních technik lze snadno automatizovat. Moderní on-line extrakční metody umožňují nástřik neupraveného biologického materiálu přímo do chromatografického systému. I v dnešní době se stále používají klasické extrakční techniky jako je LLE či SPE, trendem posledních let však je používání stále menších objemů organických rozpouštědel i vzorků, dosahování větší specifity a selektivity extrakcí a stále větší snaha o úplnou automatizaci těchto technik. Příprava vzorku musí být samozřejmě přizpůsobena následné analýze, s ohledem na použitou instrumentaci a stupeň požadované přesnosti, ať kvantitativní či kvalitativní (69, 70).

Tato kapitola bude zaměřena především na nejmodernější extrakční techniky přípravy vzorku k analýze. Tyto techniky budou rozděleny na přístupy založené na LLE a na přístupy založené na SPE.

2.6.1. Přístupy založené na liquid-liquid extrakci (LLE)

Úvodem této části bude zmíněna tradiční LLE, což je sice technika stará, ale vyvinula se z ní spousta dalších nových technik, které pracují na stejném principu. Tato kapitola se dále zabývá mikroextrakčními technikami LLME a technikou SALLE. Použité zkratky budou vysvětleny v následujících kapitolách.

2.6.1.1. Liquid-liquid extrakce (LLE, Extrakce kapalnou fází)

LLE je jednou z nejstarších, přesto dodnes široce používanou technikou přípravy vzorků. Slouží k separaci a zakoncentrování zejména organických, ale také anorganických látek z vodných vzorků (např. léčiv a jejich metabolitů z tělních tekutin) do organického rozpouštědla. K přestupu analytů z vodného roztoku vzorku do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou dochází na základě jejich rozdílné rozpustnosti v těchto dvou fázích, což je dáno rozdělovacím koeficientem voda-oktanol.

Pro úspěšnou LLE je důležitá správná volba rozpouštědel. Dále může výtěžnost extrakce ovlivnit rozpustnost vzorku, jeho pH, vzájemný poměr fází, způsob a doba trvání extrakce. Aby byla látka extrahovatelná, musí být v neionizovaném stavu (38, 45).

LLE se běžně provádí v dělicí nálevce, ve které jsou obě nemísitelné fáze promíchávány třepáním. Obě oddělené vrstvy mohou být dále použity k další analýze. K zajištění kompletní extrakce analytů do požadované fáze je potřeba provádět extrakci opakovaně. Mnohem vyšší účinnosti extrakce se dosáhne, extrahuje-li se vícekrát menším objemem organického rozpouštědla, než jednou velkým objemem.

Tato technika má ovšem řadu nedostatků, jako např. tvorbu emulze, spotřebu velkých objemů vzorků a především organických rozpouštědel, z toho plynoucí vznik velkého množství toxických odpadů, zatěžujících životní prostředí. Další nevýhodou LLE je časová náročnost a pracnost, což spolu s velkou spotřebou organických rozpouštědel a náročnou likvidací odpadů činí tuto techniku drahou. LLE je také nevhodná pro extrakci hydrofilních sloučenin. Dále je to nízká citlivost a selektivita, což je problém zejména při analýze stopových množství analytů, kde je před vlastní instrumentální analýzou často nutné provést ještě další krok vedoucí k dostatečnému zakoncentrování a izolaci požadovaného analytu.

I přes tyto nedostatky je LLE stále široce používanou technikou přípravy vzorků, zejména tělních tekutin. Určitým pokrokem je poloautomatizovaná LLE pro analýzu léčiv, která využívá 96 jamkovou destičku, tudíž umožňuje přípravu až 96 vzorků současně (71). Peng a kol. (72) dokonce vyvinuli vysoce výkonnou 96 jamkovou LLE s robotickým systémem, umožňujícím plnou automatizaci celého procesu. Doba extrakce se tím výrazně zkrátila, navíc odpadla většina náročné práce analytika. Problémy s tvorbou emulze jsou řešeny např. přidávkem soli nebo použitím centrifugace.

Přesto je snaha zavádět nové mikroextrakční techniky, které jsou citlivější, selektivnější, snadněji automatizovatelné, dosahují lepších výsledků zakoncentrování analytů než tradiční LLE, ale především mají výrazně nižší spotřebu organických rozpouštědel a tím pádem i produkci toxických odpadů, čímž jsou levnější a šetrnější k životnímu prostředí.

2.6.1.2. Liquid-liquid microextraction (LLME, Mikroextrakce kapalnou fází)

Jak již bylo uvedeno, tradiční LLE je jako technika přípravy vzorku k analýze stále hojně využívána, ale kvůli jejím nevýhodám dochází k miniaturizaci a zavádění nových metod, založených na stejném principu. Tyto tzv. mikroextrakční techniky používají minimální objemy rozpouštědel, vzniká při nich minimum toxického odpadu, jsou jednoduché, cenově výhodné, snadno automatizovatelné a obsahují minimum kroků.

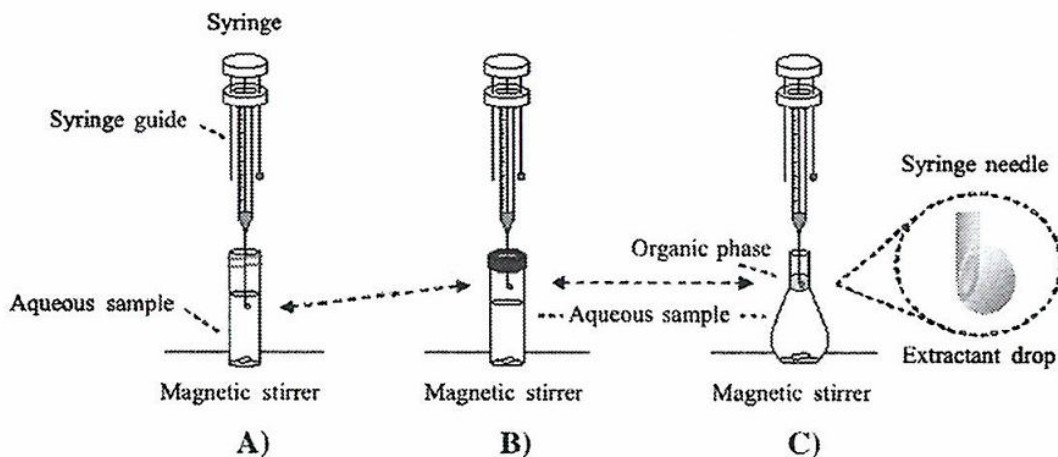
Termín LLME byl poprvé představen autory Liu a Dasgupta (73) v roce 1996 a používá se pro skupinu mikroextrakčních technik, které vznikly miniaturizací tradiční LLE. V praxi se pro tyto metody často používá také název „liquid-phase microextraction“ (LPME). Extrahované analyty se zde rozdělují stejně jako u tradiční LLE mezi vodnou fází a s ní nemísitelnou fází organického rozpouštědla, nicméně u těchto technik je objem použitého organického rozpouštědla oproti klasické LLE výrazně menší.

LLME může být prováděna v různých módech: ve statickém či dynamickém, ve dvoufázovém či třífázovém, využívajícím duté vlákno či kapku organického rozpouštědla zavěšenou na špičce jehly; headspace či direct immersion a další. Na základě technického uspořádání řadíme mezi LLME techniky single-drop microextraction (SDME), hollow fibre liquid phase microextraction (HF-LPME) a dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME). Techniku SDME dále dělíme podle způsobu provedení na direct immersion (DI-SDME), headspace (HS-SDME), liquid-liquid-liquid microextraction (LLLME) a continuous-flow microextraction (CFME) (74, 75, 76).

2.6.1.2.1. Single-drop microextraction (SDME, Mikroextrakce jednou kapkou)

SDME je jednoduchá, levná extrakční technika s minimální spotřebou organického rozpouštědla, která byla poprvé představená Jeannotem a Cantwellem (77) v roce 1997. Extrakční rozpouštědlo, tzv. extraktant, zde tvoří jedinou kapku visící na špičce extrakční jehly mikrostřikačky. Tato kapka extrakčního rozpouštědla je buď v roztoku vzorku přímo ponořená, jak tomu je v případě DI-SDME či CFME; nebo je ponořená v tenké vrstvě organické extrakční fáze o nižší hustotě než má voda, která převrstvuje vodný roztok vzorku, to je v případě LLLME; anebo visí v uzavřeném prostoru nad vzorkem, obsahujícím těkavé analyty, v případě HS-SDME. Díky velice malému objemu extrakční fáze (pouze mikrolitry) dochází k výraznému

zakoncentrování extrahovaných analytů. Vývojem a použitím SDME se podrobně zabývali zejména Xu a kol. (78) či Jeannot a kol. (79), nejnovější pokroky v SDME popsali v souhrnném článku Jain a Verma (80).



Obr. 16 Mikroextrakce jednou kapkou – A) DI-SDME, B) HS-SDME, C) LLMME (75)

Direct immersion single-drop microextraction (DI-SDME)

Tato technika je založena na přímém ponoření (DI-) mikrokapky organického rozpouštědla nemísitelného s vodou o objemu obvykle 1 – 10 μl přímo do vodného roztoku vzorku. Během expozice je kapka zavěšena na špičce jehly mikrostříkačky a roztok vzorku je míchán magnetickým míchadlem. Jedná se tedy o statický režim LLME. Po stanovené době extrakce je kapka nasáta zpět do jehly mikrostříkačky a poté nadávkována do separačního zařízení, případně přímo do detektoru (81).

Přenos analytu z vodného roztoku vzorku do kapky organického rozpouštědla probíhá až do dosažení termodynamické rovnováhy, případně do ukončení extrakce. Správné provedení tohoto typu extrakce vyžaduje, aby byl analyt výrazně rozpustnější v extrakční fázi než v samotném vzorku. Samozřejmostí je, že bude kapka tvořena rozpouštědlem zcela nemísitelným s vodou (75, 78, 82).

Nevýhodou DI-SDME je poměrně malá stabilita kapky při vyšších rychlostech míchání vzorku či při vyšších teplotách, zvláště v případech, kdy není vzorek zcela čistý. Navíc rozpouštědla s relativně vyšší rozpustností ve vodě a nižší teplotou varu nejsou pro DI-SDME vhodná z důvodu jejich velké rychlosti disoluce a odpařování. Technika není vhodná ani pro příliš kyselé vzorky, ani pro velká množství nepolárních látek, které mohou nasytit organickou fází a způsobit tak značné problémy (74, 75, 78).

Technika DI-SDME byla v praxi nedávno použita např. při stanovení nikotinu, anabasinu a kotininu v lidské moči a ve slinách (83).

Headspace single-drop microextraction (HS-SDME)

Jedná se o techniku, poprvé představenou Theisem a kol. (84), která umožňuje extrakci a zakoncentrování těkavých analytů do kapky extrakčního rozpouštědla, visící na špičce jehly mikrostříkačky v uzavřeném prostoru nad hladinou vodného vzorku (HS-). Technika umožňuje provést v jednom kroku mikroextrakci, zakoncentrování a derivatizaci. Kapka zavěšená nad roztokem vzorku totiž může obsahovat derivatizační činidlo a k derivatizační reakci dochází během expozice par těkavého analytu s povrchem kapky. Analyt se v takovém případě v malém objemu kapky zakoncentruje a ještě derivatizuje (85).

Přenos analytu je u této techniky velmi rychlý díky vysoké hodnotě difuzního koeficientu v plynné fázi. Tento přenos je ještě urychlen mícháním vodného roztoku vzorku magnetickým míchadlem. Tím je dosaženo termodynamické rovnováhy mezi vodnou a plynnou fází velmi rychle (84).

HS-SDME dovoluje použít jako extrakční fázi jak organická, tak i vodná rozpouštědla, neboť kapka není v přímém kontaktu s roztokem vzorku. Protože se netěkavé ani vysokomolekulární látky do kapky umístěné v headspace neextrahují, dochází při této mikroextrakční technice i u komplexních vzorků k zakoncentrování pouze požadovaných analytů v poměrně vysoké čistotě. Tento typ extrakce se nejčastěji používá k přípravě vzorků pro GC, ale objevují se i práce o využití této techniky ve spojení s HPLC, CE a MS (74, 75, 78).

Nevýhodou této techniky je poměrně omezené pole použitelnosti, neboť je vcelku málo těkavých analytů, nebo takových, které se na ně dají jednoduchou derivatizační reakcí převést.

Technika HS-SDME byla nedávno použita např. při analýze metamfetaminu a amfetaminu v moči (86).

Liquid-liquid-liquid microextraction (LLLME)

Tuto mikroextrakční techniku, která je vhodná k extrakci ionizovatelných analytů, vyvinuli v roce 1999 Ma a Cantwell (87). Je založena na extrakci analytů z vodného roztoku vzorku, míchaného magnetickým míchadlem, do organické vrstvy

nebo membrány s nižší hustotou než má voda a na současné zpětné extrakci do vodné mikrokapky, ponořené do této organické vrstvy.

Během extrakce musí být pH vodného roztoku i vodné kapky upravováno tak, aby byl analyt nejprve v neutrální formě, tzn. extrahovatelný do vrstvy organického rozpouštědla a poté ionizovaný, čili extrahovatelný do vodné kapky, zavěšené na hrotu jehly mikrostříkačky, ponořené do vrstvy organického rozpouštědla (75).

Druhou možností je použití dvou různých sloučenin, tzv. komplexantů, vytvářejících s analytem komplexy. První je přidán do vodného roztoku vzorku, druhý je rozpuštěn ve vodné mikrokapce. Tvorba neutrálního komplexu s analytem dovoluje jeho extrakci do organické vrstvy. V případě, že vodná mikrokapka obsahuje látku, která tvoří s analytem pevnější komplex, dochází k jeho zpětné extrakci do této mikrokapky (75).

LLLME je ve srovnání s ostatními SDME technikami složitější na provedení, je však vhodnější pro spojení se separačními technikami jako HPLC a CE, z důvodu vodného charakteru konečného extraktu (75).

LLLME byla použita např. při analýze lokálních anestetik v lidské plazmě (88), metamfetaminu a amfetaminu v moči (89) či fentanylu v plazmě a moči (90). Nedávno byla tato technika využita při analýze alkaloidů v lidské moči (91) a fluorochinolonů taktéž v lidské moči (92).

Continuous-flow microextraction (CFME, Mikroextrakce kontinuálním tokem)

Jedná se o další modifikaci SDME, kterou poprvé představili autoři Liu a Lee (93), u níž probíhá extrakce ve speciální skleněné extrakční komoře. Jedná se o dynamickou extrakci, ve které je vzorek místo míchání pumpován peristaltickou pumpou kontinuálně a konstantní rychlostí přes extrakční komoru do odpadu. Přitom se utvoří na špičce jehly mikrostříkačky kapka, která je ponořená do roztoku vzorku a dochází k extrakci. Na rozdíl od ostatních SDME technik je zde kapka extrakčního rozpouštědla v kontaktu s neustále novým a proudícím roztokem vzorku. Zásadou tohoto kontinuálního kontaktu je zde účinnost extrakce vyšší, než u extrakcí ve statickém módu. Rychlost extrakce je přímo úměrná rychlosti průtoku roztoku vzorku extrakční komorou. Nevýhodou této techniky je větší spotřeba roztoku vzorku, případně poměrně krátká doba expozice extrakčního činidla s roztokem vzorku.

Proto Xia a kol. (94) později CFME modifikovali na tzv. **cycle-flow microextraction**. Zde je vzorek opět pumpován přes extrakční komoru, ale ne do

odpadu jako u klasické CFME, ale zpátky do nádoby se vzorkem. Díky tomu může vzorek cirkulovat přes extrakční komoru libovolně dlouho, opakovaně, čímž se dosáhne vyšší účinnosti extrakce. Průtoková rychlost vzorku by měla být taková, aby zajistila efektivní mikroextrakci analytů, přitom aby nedošlo k uvolnění kapky či tvorbě bublin, což jsou obecně hlavní problémy DI-SDME (75).

2.6.1.2.2. Hollow fibre liquid phase microextraction (HF-LPME, Mikroextrakce využívající duté vlákno)

HF-LPME je technika, poprvé představená v roce 1999 autory Pedersen-Bjergaardem a Rasmussenem (95), která využívá k extrakci a prekoncentraci analytů z vodných vzorků hydrofóbní porézní duté vlákno. To je tvořeno nejčastěji polypropylenem, je umístěno na konci jehly mikrostříkačky a slouží jako ochranný film, proto je tato technika vhodná i pro extrakci analytů z komplexnějších vzorků, zejména biologického materiálu (96, 97).

Lumen dutého vlákna je naplněno extrakčním rozpouštědlem, které může být organické v případě dvoufázové HF-LPME, nebo vodné v případě třífázové HF-LPME. Duté vlákno je před samotnou extrakcí ponořeno do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, čímž dojde k navzlínání tohoto rozpouštědla kapilárními silami do pórů ve stěně dutého vlákna. Analyzované analyty jsou extrahovány z vodného roztoku vzorku do rozpouštědla v lumen dutého vlákna (98).

U dvoufázové HF-LPME je analyt vyextrahován z vodného vzorku do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, které je imobilizováno v pórech dutého vlákna a vyplňuje také jeho lumen. Extrakt je následně podroben analýze, nejčastěji plynovou chromatografií (99).

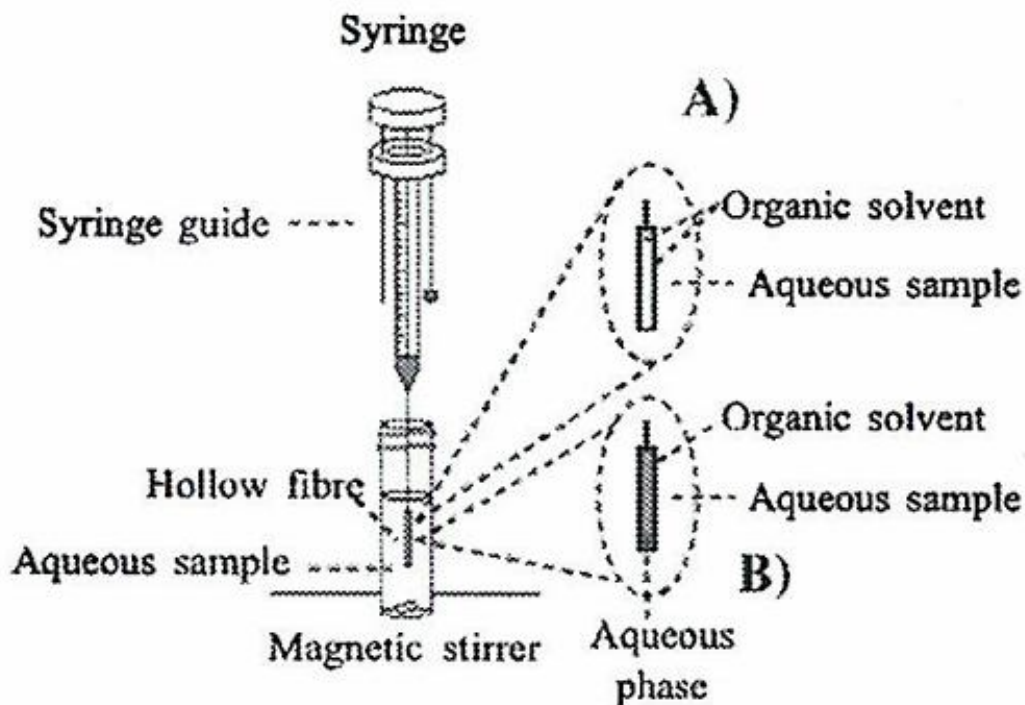
U třífázové HF-LPME jsou analyty extrahovány z vodného vzorku přes tzv. supported liquid membrane (SLM), tvořenou organickým rozpouštědlem imobilizovaným v pórech dutého vlákna, do vodné extrakční fáze vyplňující lumen dutého vlákna. Jedná se prakticky o HF-LLLME. Takto získaný vzorek se analyzuje nejčastěji pomocí HPLC nebo CE. Díky přítomnosti SLM membrány je tato technika často nazývána SLM extrakce, nebo také hollow-fibre supported liquid membrane extraction (100).

K výhodám HF-LPME patří vyšší extrakční účinnost oproti SDME technikám, které lze dosáhnout intenzivnějším mícháním, aniž by došlo ke ztrátě mikroextraktu. Také je zde větší plocha kontaktu mezi vodným vzorkem a extrakční fází. Dále je to

možnost analýzy komplexnějších vzorků, neboť extrakční fáze je zde chráněna vláknem. Navíc malá velikost pórů brání extrakci látek o větší molekulové hmotnosti, takže se získá velmi čistý extrakt. K dalším výhodám patří snadná automatizace, extrémně nízká spotřeba rozpouštědel a možnost širokého využití (70, 99).

Technika má bohužel také určité nevýhody. Duté vlákno je poměrně křehké, bývá problém s jeho spojením s jehlou mikrostříkačky, navíc během tohoto kroku hrozí riziko kontaminace. Dále je to stále poměrně malá nabídka komerčně dostupných zařízení (74, 75, 76, 101).

I přes uvedené nedostatky se však jedná o nejpoužívanější LLME techniku v praxi. Jejím využitím se zabývají např. publikace Pedersen-Bjergaarda a kol. (102) či Rasmussena a kol. (103), z nichž je patrné, že nejčastějšími oblastmi využití HF-LPME jsou analýza životního prostředí, analýza potravin a stanovení léčiv v různých biologických materiálech. Nově byla HF-LPME použita např. při analýze antidepresiv amitriptylinu, imipraminu a sertralinu v moči a plazmě (104), flunitrazepamu v plazmě a moči (105), fluoxetinu a norfluoxetinu v lidské plazmě (106), warfarinu v lidské plazmě (107) či amfetaminu, kofeinu a ketaminu v moči (108).



Obr. 17 Mikroextrakce využívající duté vlákno – A) HF-LPME, B) HF-LLLME (75)

2.6.1.2.3. Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME, Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému)

DLLME, představená Rezaem a kol. (109), je jednoduchá a rychlá mikroextrakční technika založená na použití vhodného extrakčního organického rozpouštědla s vyšší hustotou než má voda, např. tetrachlormethanu, tetrachloroethylenu, chloroformu, sirouhlíku, nitrobenzenu, brombenzenu, chlorbenzenu či 1,2-dichlorbenzenu a disperzního rozpouštědla s vysokou mísitelností s vodnou fází, jako je např. methanol, ethanol, acetonitril či aceton.

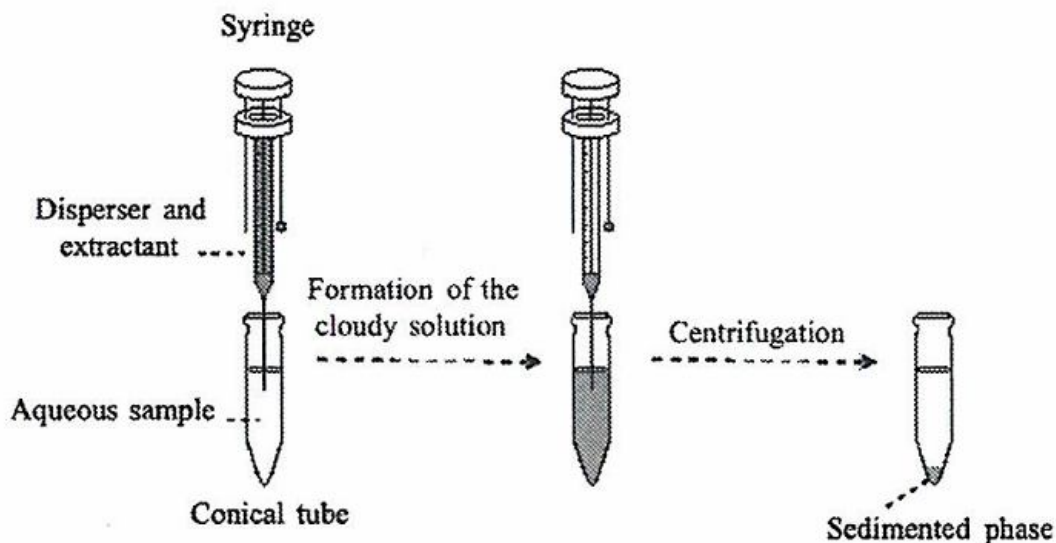
Rychlým vstříknutím několika mikrolitrů extrakční fáze a disperzního rozpouštědla do vodného roztoku vzorku, případně následným jemným protřepáním, dojde ke vzniku malých kapiček extrakčního rozpouštědla rozptýlených v celém objemu vzorku, ve kterých se analyzovaná látka rozpustí. Směs je poté centrifugována, jemné kapičky extrakční fáze sedimentují ke dnu kónické zkumavky, odkud jsou sebrány pomocí mikrostříkačky s dlouhou jehlou a tento extrakt je analyzován nejčastěji pomocí GC, objevují se však i práce ve kterých je tato technika použita ve spojení s HPLC, CE a MS (74, 78).

Povaha disperzního rozpouštědla ovlivňuje rozložení kapek, jejich průměrnou velikost a také viskozitu emulze. Rozptýlení kapalin hraje hlavní roli v separačních procesech a ovlivňuje rychlost extrakce. Protože je plocha povrchu mezi extrakčním rozpouštědlem a vodným vzorkem obrovská, je rovnovážný stav dosažen velmi rychle, a proto je také extrakční čas velmi krátký, což je hlavní výhodou DLLME (75).

Technika je limitována poměrně malým počtem extrakčních činidel, schopných účinně extrahovat požadované analyty, protože podmínky, jako je jeho vyšší hustota než hustota vody, tvorba stabilního zakaleného roztoku a snadné odsátí ze dna kónické zkumavky po centrifugaci, splňuje pouze několik organických rozpouštědel. Navíc je tato mikroextrakční technika obtížně automatizovatelná.

K výhodám této techniky patří jednoduchost provedení, rychlost ustavení reakční rovnováhy, nízká cena, nízká spotřeba organických rozpouštědel a poměrně vysoká účinnost. Využití této techniky v kombinaci s jinými extrakčními metodami jako SPE či SFE bylo popsáno v review Rezaee a kol. (110).

DLLME technika přípravy vzorku je využívána především v aplikacích týkajících se analýzy potravin, monitorování životního prostředí a v bioanalýze. Byla použita např. při stanovení léčiv amitriptylinu, klomipraminu a thioridazinu v moči (111) či 7-aminoflunitrazepamu v moči (112).



Obr. 18 Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (75)

Později Shemirani a kol. techniku DLLME modifikovali a vyvinuli tzv. **Cold-induced aggregation microextraction (CIAME)** (113). Zde se k vodnému roztoku vzorku přidává tzv. iontová kapalina (IL, ionic liquid), neionogenní surfaktant (povrchově aktivní činidlo) a pokud je to potřeba, tak ještě derivatizační činidlo. Rozpuštění IL ve vzorku je dosaženo zahříváním směsi v kónické centrifugační zkumavce v termostátované vodní lázni. Poté je centrifugační zkumavka umístěna do ledové lázně, kde podobně jako u DLLME vznikne zakalený roztok. Následná procedura je podobná jako u DLLME. Oproti DLLME tedy CIAME používá místo organického rozpouštědla jako extrakční fázi IL, čímž se vyvaruje také použití disperzního rozpouštědla. Nevýhodou této metodiky je však velká pracnost a časová náročnost. Kvůli velké viskozitě IL musí být do vzorku přidán neionogenní surfaktant, který zabrání adhezi IL na stěnách zkumavky po centrifugaci.

Další modifikací DLLME je tzv. **Liquid-phase Microextraction Solidification of Floating Organic Drop (DLLME-SFO)**. Jak sám název napovídá, jedná se o mikroextrakční techniku založenou na tvorbě disperzního systému s tuhnoucí plovoucí organickou kapkou. Postup spočívá v přidávku malého množství s vodou nemísitelného organického rozpouštědla s teplotou tání blízkou laboratorní teplotě (např. 1-undekanolu s teplotou tání 19 °C) a disperzního činidla k vodnému roztoku vzorku. Roztok se po určitou dobu míchá pomocí magnetického míchadla, poté je zkumavka se vzorkem centrifugována a nakonec vložena do ledové lázně. Ochlazením organické rozpouštědlo s vyextrahovanými analyty ztuhne a lze jej snadno odebrat k další analýze,

nejčastěji pomocí GC. Technika je jednoduchá, levná, rychlá, nevyžaduje žádné speciální zařízení a spotřebovává velmi malá množství organických rozpouštědel (114, 115).

2.6.1.3. Salting-out assisted liquid-liquid extraction (SALLE, Extrakce vysolováním)

Na rozdíl od klasické LLE, u které dochází k rozdělování analytů zpravidla mezi vodnou fází a s vodou nemísitelné nepolární organické rozpouštědlo, je vhodná k extrakci nepolárních látek, ale díky nízké dielektrické konstantě extrakční fáze neumožňuje extrakci polárních nebo nabitých látek, využívá se v těchto případech techniky SALLE.

SALLE tedy používá jako extrakční fázi polárnější organické rozpouštědlo (např. acetonitril), které zajistí dobrou rozpustnost a možnost extrakce polárnějších analytů. Tato rozpouštědla jsou však mísitelná s vodou, proto nemohou být použita v konvenční LLE, neboť by nedošlo k rozdělení fází. SALLE tento problém řeší přidáním velkého množství anorganických či organických solí do extrakční směsi, což způsobí oddělení extrakčního rozpouštědla a vytvoření dvoufázového systému. Tento jev se označuje jako „solí indukované oddělení fází“ či „vysolování“ a byl sledován u řady s vodou mísitelných organických rozpouštědel, např. u acetonu, methanolu, ethanolu či acetonitrilu. Stupeň oddělení fází závisí na povaze soli a na její koncentraci. Nejčastěji se používá chlorid sodný a síran hořečnatý. V některých případech lze stejného efektu dosáhnout vysokou koncentrací sacharidů (116, 117).

Efektu „vysolení“ lze využít také ke zlepšení extrakce do nepolárních, s vodou nemísitelných organických rozpouštědel. U analytů, které se špatně extrahují běžně používanými organickými rozpouštědly, může přídavek soli zvýšit extrakční účinnost a tím citlivost a přesnost analýzy. Tímto se zabývali např. Nikolić a kol. (118), když zkoumali vliv různých solí na účinnost extrakce fenolických látek diethyleterem a diisopropyleterem z vodného roztoku. Prokázali výrazné zlepšení extrakční účinnosti oproti systému bez přídavku soli.

„Vysolování“ se také efektivně využívá u headspace extrakčních technik, neboť se zjistilo, že přídavek zejména anorganických solí vede ke zvýšení koncentrace těkavých látek v prostoru nad vodným roztokem. Přídavek soli do vzorku může rovněž podpořit adsorpci hydrofóbních analytů z vodného roztoku na SPME vlákna či SPE kazety.

Liu a kol. (119) použili v rámci miniaturizace této techniky 1 ml injekční stříkačku jako fázové separační zařízení. Jakmile došlo k oddělení fází, byla spodní vodná vrstva odstraněna stlačením pístu stříkačky, takže v ní zůstala pouze původně horní vrstva organického rozpouštědla, obsahující extrahované analyty. Tím byla spotřeba organických rozpouštědel snížena na minimum. Technika byla otestována na vodném vzorku s obsahem sulfonamidů.

Technika SALLE je jednoduchá, rychlá, levná, nevyžaduje žádné speciální vybavení a díky mísitelnosti extrakčního rozpouštědla s vodou je kompatibilní prakticky se všemi analytickými systémy. Její nevýhodou je často nedostatečné vyčištění extraktu, proto je užitečná pouze v případech, kdy je použita velmi selektivní technika detekce, např. tandemová MS (120). Druhou možností je dočištění extraktu další extrakční technikou, např. SPME. Nevýhodou je také, že konečný extrakt zpravidla obsahuje určité množství soli, které může způsobit problémy v následující LC-MS analýze, neboť způsobuje snížení odezvy MS detektoru (121).

SALLE byla v bioanalýze využita k extrakci léčiv a dalších biologicky aktivních látek z tělních tekutin, např. drogy γ -hydroxybutyrátu z krve a moči (122), amoxapinu a nortriptylinu z plazmy a séra (123), simvastatinu a jeho metabolitu kyseliny simvastatinu z lidské plazmy (124) či entekaviru opět z plazmy (125).

2.6.2. Přístupy založené na solid-phase extrakci (SPE)

V této kapitole bude popsána nejprve klasická SPE, která je základem všech dalších uvedených technik. Dále zde budou podrobně popsány techniky SPME a další příbuzné mikroextrakční techniky jako mikroextrakce na sorbentu v pipetovací špičce, mikroextrakce na čípech, MEPS a SPDE, poté monolitická rotační extrakce a SBSE a nakonec on-line SPE pomocí LPS a RAM. SPE využívající selektivní sorbenty, tzn. MIPs, imunosorbenty a aptamery, bude popsána v samostatné kapitole (2.6.3.). Použité zkratky budou vysvětleny v následujících kapitolách.

2.6.2.1. Solid-phase extraction (SPE, Extrakce na pevnou fázi)

SPE je v dnešní době nejpopulárnější technikou přípravy vzorku k analýze. Postupně nahrazuje dodnes stále široce používanou klasickou LLE. Je to dáno především spoustou jejích výhod oproti LLE, jako je vyšší výtěžnost (recovery), efektivnější zakoncentrování analytu, nižší spotřeba organických rozpouštědel, lepší selektivita, specifická a opakovatelnost, kratší doba přípravy vzorku, snadnější postup

provedení a možnost automatizace. Zvláště výhodné je spojení SPE s moderními chromatografickými přístupy (71).

U SPE jsou extrahované analyty rozdělovány mezi pevnou a kapalnou fází. Pevnou fází je sorbent, který slouží k zachycení a zakoncentrování analytů z vodného roztoku. V dnešní době existuje celá řada komerčně dostupných sorbentů, využívajících různých mechanismů retence analytů. Analyty musí mít vyšší afinitu k pevné fázi (sorbentu) než k matrici vzorku. Zatímco jsou cílové analyty zachyceny správně zvoleným sorbentem, jsou balastní látky během promývání vymyty do odpadu. Poté jsou zadržené analyty eluovány vhodným elučním činidlem z pevné fáze do připravené lahvičky, případně přímo do chromatografického systému. SPE se používá zejména k přípravě kapalných vzorků, k extrakci a zakoncentrování netěkavých analytů, používá se však také k před-extrakci pevných vzorků do rozpouštědla (38).

Volba sorbentu je klíčovým bodem celé SPE, neboť má přímý vliv na parametry jako je selektivita, afinita či výtěžnost extrakce, což bylo potvrzeno několika studiemi (126, 127). Tento výběr závisí především na fyzikálně-chemických vlastnostech extrahovaných analytů, na interakcích vybraného sorbentu s funkčními skupinami analytů a na druhu matrice vzorku a jejích interakcích se sorbentem i s analyty. Interakce mezi sorbentem a analyty mohou být založeny na adsorbci, vodíkových vazbách, polárních či nepolárních interakcích, či kationtové nebo aniontové výměně (128).

V současné době existuje obrovské množství komerčně dostupných SPE sorbentů, od tzv. „normálních“ polárních fází (oxid hlinitý, aktivní uhlí, silika), přes tzv. „reverzní“ nepolární fáze (chemicky modifikovaný silikagel s navázanými uhlovodíkovými řetězci - nepolárními funkčními skupinami, nejčastěji C8 či C18), dále iontové výměnné fáze - katexy (např. sulfonové skupiny, karboxylové skupiny) a anexy (amoniové či amino skupiny), Florisil (aktivovaný křemičitan hořečnatý), grafitický uhlík, polymerní materiály (např. PS-DVB: polystyren-divinylbenzen, PMA: polymetakrylát, MA-DVB: metakrylát-divinyl-benzen), tzv. mixed-mode sorbenty, které obsahují současně nepolární a silně kationické či anionické skupiny, vysoce specifické sorbenty jako molekulárně vtištěné polymery (MIPs), imunosorbenty či aptamery, sorbenty pro on-line extrakce jako např. materiály s omezeným přístupem (RAM) či s velkými částicemi (LPS), či v poslední době také monolitické sorbenty (129).

Vývoj sorbentů pro SPE je podobný vývoji stacionárních fází pro HPLC. Snahou je vytvořit materiály s co nejlepšími vlastnostmi z hlediska stability, selektivity, dosažené výtěžnosti extrakce, ceny a životnosti. Vývojem a použitím nových extrakčních sorbentů pro SPE se zabývá spousta přehledových článků (130, 131).

Výsledkem vývoje jsou např. nové polymerní materiály, které mají oproti klasickým silikagelovým řadu výhod. Jsou stabilní i při vysokých nebo naopak nízkých hodnotách pH a neobsahují silanoly, které mohou způsobit ireverzibilní vazbu některých analytů, např. tetracyklinů (132).

Stálost sorbentů v co nejširším rozsahu pH je důležitá zejména pro extrakci kyselých a bazických látek. Extrahovány mohou být pouze látky elektroneutrální. Kyselé analyty proto musí být extrahovány za kyselých podmínek, bazické analyty v zásaditém prostředí (133). Weigel a kol. (184) srovnávali extrakční účinnost u kyselých, neutrálních a bazických léčiv z vodných vzorků, dosaženou na různých komerčně dostupných sorbentech. Pro neutrální analyty byly dosaženy poměrně srovnatelné výtěžnosti, výrazně větší rozdíly ve výtěžnosti se objevovaly u bazických a zejména kyselých léčiv (bezafibrát, ibuprofen, diklofenak). Pro kyselé látky bylo dosaženo nejlepší výtěžnosti na extrakčních sorbentech Oasis HLB.

Sorbenty pro SPE jsou plněny zpravidla do kartridží různých tvarů a velikostí. Nejčastěji jsou to injekční stříkačky o různých objemech, ploché disky, 96 jamkové destičky či kolonky (71).

SPE může být prováděna v off-line, ale také v on-line konfiguraci. K off-line konfiguraci je vhodné použít speciální zařízení, které umožňuje provádět extrakci až na 24 kolonkách současně. Skládá se z vakuové nádoby (komory) s možností regulace vakua a horní části, která obsahuje až 24 jednotlivě uzavíratelných vstupů, na které se jednoduše nasadí SPE kartridže. Do vakuové komory se pod každý používaný uzavíratelný vstup vloží nejprve zkumavka k jímání balastních látek ze vzorku a promývací fáze, následně se tato zkumavka vymění za lahvičku, do které se eluuje zachycený analyt. Roztok vzorku je „protážen“ přes sorbent působením vakua v komoře. Je důležité, aby při nanášení vzorku byla průtoková rychlost přes sorbent co nejnižší, aby se stačil analyt zachytit v sorbentu. Stejně tak by měla být nízká rychlost průtoku při eluci analytů, aby došlo k jejich maximálnímu uvolnění ze sorbentu do elučního činidla. Právě standardizace průtokových rychlostí, které se regulují většinou utahováním resp. povolováním závitů jednotlivých uzavíratelných vstupů, je při použití tohoto zařízení hlavním problémem. Proto lze s výhodou použít moderní

automatizované SPE zařízení s robotickým pipetovacím systémem, které zajistí nejen dokonalou standardizaci postupu, ale také vysokou výkonnost přípravy vzorků (71, 130).

Obecně existují dva způsoby provedení extrakce na pevnou fázi: 1. zadržení sledovaných analytů v sorbentu, vymytí balastních látek a následná eluce analytů malým množstvím rozpouštědla, což je častější způsob a 2. zachycení interferujících balastních látek v sorbentu a vymytí sledovaných analytů.

Samotný postup SPE zahrnuje nejprve smočení a aktivaci sorbentu extrakční kolonky, tzv. kondicionaci. Ta se provádí nanesením definovaného objemu doporučeného rozpouštědla na kolonku a poté nanesením definovaného objemu destilované vody. Poté se nanese na kolonku vzorek. Kolonka nesmí do nanesení vzorku vyschnout. Následuje vymytí balastních látek vhodnou promývací fází. Po promytí se nechá odsát veškerý promývací roztok, aby nekontaminoval a neředil eluovaný analyt a následuje eluce analytu z kolonky do připravené lahvičky. Získaný produkt je dále možné odpařit do sucha a rekonstituovat v minimálním objemu vhodného rozpouštědla nebo rovnou použít k analýze.

SPE je v současnosti vynikající technikou pro extrakci a zakoncentrování stopových koncentrací analytů z komplexních maticí. Díky vývoji nových typů sorbentů s vysoce specifickými povrchovými plochami se SPE stala selektivní citlivou technikou použitelnou k extrakci celé řady látek, od neutrálních, přes kyselé až po bazické. Je jednoduchá a snadno automatizovatelná, přesto má několik nevýhod. Je poměrně časově náročná, relativně drahá, neboť většina SPE sorbentů je vyráběna na jedno použití. Nevýhodou je také výrazný vliv matrice na schopnost sorbentu extrahovat analyt. Některé matrice jsou dokonce schopny sorbent prakticky „ucpat“. Také spotřeba organických rozpouštědel je, v porovnání s mikroextrakčními technikami, stále poměrně vysoká (128).

2.6.2.2. Solid-phase microextraction (SPME, Mikroextrakce na pevnou fázi)

SPME je moderní, jednoduchá a účinná extrakční technika přípravy vzorku k analýze, používaná k izolaci a zakoncentrování analytů hlavně z kapalných vzorků, prakticky bez potřeby organických rozpouštědel. Byla vyvinuta Arturem a Pawliszynem (135) v roce 1990. Může být použita pro extrakci polárních i nepolárních analytů a pro zpracování různých typů maticí. Mechanismus SPME je stejný jako u klasické SPE.

Odlíšná je technika provedení a objem sorbentu. Jedná se vlastně o miniaturizovanou verzi SPE.

SPME je v podstatě dvoukroková metoda. Nejprve dochází k rozdělení analytů mezi matici vzorku a sorbent extrakčního zařízení, poté k desorpci zakoncentrovaných analytů do analytického separačního systému. Extrakce analytů z matrice na sorbent samozřejmě nejsou kompletní, probíhají do vytvoření rovnovážného stavu. Nicméně není nezbytné dosáhnout tohoto stavu a v praxi se běžně extrakce provádí pouze po určitém definovanou dobu, která však musí být u celé série vzorků stejná (136).

Hlavní výhody SPME ve srovnání s klasickou SPE jsou výrazné snížení spotřeby organických rozpouštědel, snížení potřebného objemu vzorku, často také spojení přípravy vzorku a vlastní analýzy do jednoho kroku. Největším problémem SPME je však bezpochyby maticový efekt. Přítomnost vysokých koncentrací maticových komponent může kompetitivně vytěsnit cílový analyt z vazebných míst sorbentu a způsobit tak velké chyby při kvantifikaci tohoto analytu. U SPME na vlákně může být problémem omezený objem stacionární fáze, který nemá dostatečnou kapacitu a může tak vést k nekompletní extrakci. Vlákno bývá zpravidla křehké a hrozí jeho mechanické poškození.

V současné době existují 2 základní módy SPME (74, 75, 137):

- headspace (HS-) a direct-immersion (DI-) fiber (based) SPME (mikroextrakce na vlákně)
- in-tube (IT-) SPME (mikroextrakce v kapilárních kolonách)

2.6.2.2.1. Fiber (based) SPME (Mikroextrakce na vlákně)

Mikroextrakce na vlákně je tvořena modifikovanou injekční stříkačkou opatřenou nerezovou ocelovou jehlou (kapilárou) s taveným křemenným vláknem (fused-silica fiber tip), které je pokryté organickým polymerním sorbentem o tloušťce většinou 100 μm . Nejčastěji se používá polydimethylsiloxan (PDMS). Toto sorbentem pokryté vlákno se pomocí pístu vysunuje ven nebo zasunuje dovnitř do jehly. Během transportu, skladování a manipulace je vlákno vždy zatažené dovnitř do jehly (70).

V tomto jednoduchém zařízení lze integrovat procesy extrakce, prekoncentrace, případně i derivatizace a přenosu extrahovaných analytů do chromatografu, celý proces lze navíc jednoduše automatizovat. Postup spočívá v propíchnutí septa lahvičky se vzorkem jehlou, ze které se vysune křemenné vlákno pokryté sorbentem. Vlákno je vystaveno vzorku a cílový analyt je zadržen sorbentem. Poté se vlákno zasune zpět do

jehly, ta se vytáhne z lahvičky se vzorkem, následuje propíchnutí septa dávkovacího portu GC, vlákno se opět vysune z jehly ven a nastává desorpce zadržených analytů do kapilární kolony GC (138).

Sorbent pokrývající křemenné vlákno je klíčovou složkou celé extrakce, proto byla jeho vývoji a optimalizaci věnována velká pozornost (136, 139). V posledních letech se jako sorbenty pro SPME vlákna testovaly např. i molekulárně vtištěné polymery (MIPs), což jsou vysoce selektivní sorbenty (140). Budou podrobně probrány v samostatné kapitole (2.6.3.1.). Posledním vývojem jsou tzv. superelastická vlákna, která kromě nových sorbentů obsahují také složky s elastickými vlastnostmi, které zabraňují mechanickému poškození vlákna a zvyšují tak robustnost celé extrakce (141). Kromě tradičních křemenných vláken pokrytých vrstvičkou sorbentu se v posledních letech testují také nová monolitická vlákna. Shi a kol. např. vyvinuli nový uhlíkový monolit (142), který má výrazně lepší charakteristiky než tradiční pokryté křemenné vlákno, např. rychlejší dosažení extrakční rovnováhy či větší extrakční kapacitu. Toto monolitické vlákno bylo použito např. pro přímou extrakci kyseliny listové z lidského séra (143).

Podle způsobu vystavení vlákna vzorku rozlišujeme 2 základní režimy mikroextrakce na vlákně. Prvním módem je režim přímého ponoření, tzv. direct-immersion (DI-SPME), kdy je vlákno přímo ponořeno do roztoku vzorku. Druhým režimem je tzv. headspace (HS-SPME), kdy je vlákno umístěno v uzavřeném prostoru nad hladinou vzorku a zachytávají se na něm těkavé analyty (144).

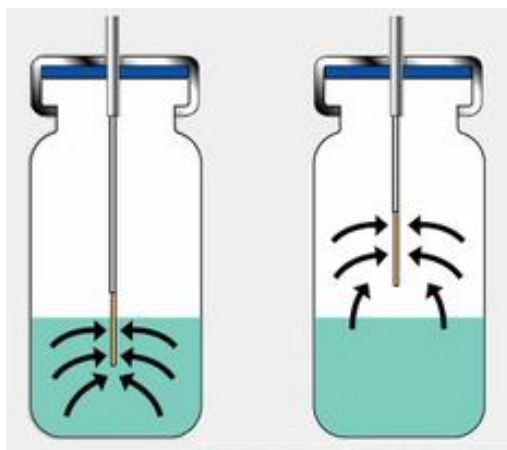
K výhodám mikroextrakce na vlákně patří jednoduchost provedení, prakticky nulová spotřeba organických rozpouštědel, malé požadavky na vybavení, snadná automatizovatelnost, dobrá linearita a vysoká senzitivita. Je vyvinuta speciálně pro spojení s GC. Technika je výhodná zejména v případě, kdy je potřeba provést derivatizaci vzorku. Ta může být provedena na vlákně přímo v průběhu SPME. Této tzv. in-situ derivatizace již bylo využito při stanovení některých léčiv v moči (145). Hlavní výhodou HS-SPME je ochrana vlákna před přímým kontaktem se vzorkem a tím před kontaminací.

Hlavní nevýhodou mikroextrakce na vlákně je její problematické spojení s HPLC. Nevýhodou HS-SPME je omezená možnost použití, neboť existuje poměrně málo látek těkavých nebo na těkavé snadno derivatizovatelných. U DI-SPME je největším problémem matricový efekt, zejména pokud vzorek obsahuje příliš mnoho balastních látek. Další nevýhodou je delší čas potřebný k extrakci některých analytů a

omezená kapacita vlákna. Desorpce analytů z vlákna trvá déle, než nástřik extraktů získaných LLE či SPE. Nízká robustnost techniky je dána snadným poškozením či zlomením vlákna, které má navíc limitovanou dobu použitelnosti. Při DI-SPME může být vlákno poškozeno irreverzibilní adsorpcí proteinů ze vzorku na vrstvu sorbentu. Jistou možností je vlákno umístit do celulózy membrány, což přidává tzv. size exclusion efekt, tzn. že látky o molekulové hmotnosti větší než velikost pórů přes membránu neprojdou, nevýhodou je však výrazné prodloužení extrakčního času a poměrně časté ucpání membrány matricí vzorku. (146)

Technika DI-SPME byla v praxi použita v bioanalýze při stanovení léčiv v tělních tekutinách, např. metoprololu, oxprenololu, mexiletinu, propranololu a propafenonu v plazmě (147), či antibiotik linezolidu a daptomycinu v plné krvi (148).

HS-SPME byla použita při stanovení např. antidepresiva venlafaxinu v plné krvi (149) či amfetaminu a metamfetaminu v lidské moči (150).



Obr. 19 Mikroextrakce na vlákně – vlevo DI-SPME, vpravo HS-SPME (151)

2.6.2.2.2. In-tube microextraction (IT-SPME, Mikroextrakce v kapilárních kolonách)

Druhým, novějším módem SPME je mikroextrakce probíhající v kapilárních kolonách. Nejčastěji se používají tavené křemenné kapilární kolony, které mají sorbentem pokryté vnitřní stěny, nebo jsou sorbentem naplněny a jsou vhodné k on-line extrakci přímo spojené s chromatografickým systémem, nejčastěji s HPLC. Vzorek je během extrakce několikrát protažen skrz kapiláru, kde dojde k zadržení analytů sorbentem, poté následuje přímá desorpce/eluce zadržovaných analytů z kapiláry mobilní fází na separační kolonu HPLC (74, 152).

Technika byla poprvé představena Eisertem v roce 1997 (152). Jako kapilární kolony pro IT-SPME se zpočátku používaly komerčně dostupné GC kolony (153), později kapiláry naplněné monolitickými materiály (154), dále kapiláry plněné β -cyklodextrinem (155), materiály s omezeným přístupem (RAM) (156) nebo molekulárně vtištěnými polymery (MIPs).

V současné době se stále více používají jako sorbenty v kapilárních kolonách monolitické materiály, které díky svým výhodám, jako je rychlý přenos hmoty, možnost nadávkování většího objemu vzorku či nízký zpětný tlak, pomalu vytlačují klasické částicové sorbenty (156).

K podpoření extrakce či k usnadnění detekce může být provedena derivatizace analytů. Většinou se provádí derivatizace ještě před extrakcí (137). Ke zlepšení extrakce lze provést i derivatizaci monolitického sorbentu, což bylo vyzkoušeno např. na extrakci klenbuterolu z moči (157).

Jak již bylo uvedeno výše, IT-SPME je výhodná zejména pro spojení s HPLC, lze ji však spojit on-line či off-line i s jinými separačními zařízeními. On-line spojení této techniky s HPLC se realizuje nejčastěji technikou column-switching (158). Druhou možností je umístění kapilární kolony do smyčky autosampleru. Off-line IT-SPME se zabývali např. Zhang a kol. (159). Vyvinuli tzv. polymer monolith microextraction (PMME), která je složena z plastové injekční stříkačky spojené s polymerní monolitickou kapilárou. Sorpce analytů bylo dosaženo protlačením určitého objemu vzorku přes monolitickou kapiláru, desorpce je provedena stejným protlačením tentokrát přesného objemu vhodného rozpouštědla a extrahovaný roztok je sbírán do lahvičky pro následnou analýzu. Použití PMME je velmi jednoduché. Extrahovaný vzorek může být analyzován pomocí HPLC, GC (160), či CE (161).

IT-SPME je jednoduchá, snadno automatizovatelná extrakční technika s vysokou přesností a citlivostí, krátkou dobou analýzy, nízkou spotřebou organických rozpouštědel a s relativně nízkými pořizovacími náklady. Na rozdíl od mikroextrakce na vlákne netrpí nedostatečnou extrakční kapacitou, ani problémy se spojením s HPLC. Její nevýhodou je nutnost odstranit ze vzorku před extrakcí větší částice filtrací nebo centrifugací, aby nedošlo k ucpaní kapilární kolony (162).

In-tube SPME byla v praxi použita k analýze léčiv v biologickém materiálu, např. ke stanovení některých antidepresiv v lidské plazmě (163), rifampicinu v plazmě (164) či interferonu alfa v plazmě (165).

2.6.2.3. Tip-based microextraction (Mikroextrakce na sorbentu v pipetovací špičce)

V posledních letech roste popularita mikroextrakcí prováděných na sorbentech zafixovaných do plastových pipetovacích špiček k mikropipetám. Tento na provedení velice jednoduchý typ extrakce se používá zejména k purifikaci, zakoncentrování a selektivní izolaci proteinů a peptidů při studiu genomiky, proteomiky a metabolomiky, ale také např. biologicky aktivních látek v tělních tekutinách. Technika je v odborných článcích také často nazývána „disposable pipette extraction“ (166).

Tento formát mikroextrakce je tedy založen na pevném sorbentu zafixovaném uvnitř plastové pipetovací špičky. Celého extrakčního procesu je dosaženo opakováním cyklu nasátí/vypuzení vzorku do/z pipetovací špičky přes vrstvu sorbentu pomocí standardní manuální mikropipety. V sorbentu dojde k zadržení a zakoncentrování cílových analytů, které jsou následně eluovány použitím vhodného elučního činidla. Eluci zpravidla předchází promytí vhodným promývacím roztokem, čímž dojde k odstranění nežádoucích balastních látek (137).

Ve srovnání s tradiční SPE je postup extrakce v pipetovací špičce jednodušší, rychlejší a i přesto, že jsou pipetovací špičky se zafixovaným sorbentem výhradně na jedno použití, poměrně levný. Pipetovací špičky se zabudovaným sorbentem jsou nyní na trhu k dispozici od několika výrobců, např. ZipTip[®] od Millipore (Bedford, USA), Omix[®] od Varian (Palo Alto, USA) a NuTip[®] a MonoTip[®] C₁₈ od GL Sciences (Tokio, Japonsko).

Jako sorbenty do pipetovacích špiček se používají hlavně monolitické materiály, které mohou být buď na bázi silikagelu, nebo polymerní. K zafixování silikagelových monolitů do pipetovacích špiček se používá nejčastěji supersonikace. Často se používají modifikované silikagelové monolity, např. C₁₈ či monolity s obsahem titanových částic (167). Polymerní monolitické materiály nevyžadují k fixaci do pipetovacích špiček supersonikaci. Působením UV záření či tepla vznikají polymerní monolity in-situ přímo v plastové špičce (168).

V současné době se běžně používají automatické robotické extrakční systémy v 96 jamkovém formátu, vybavené špičkami se zabudovaným monolitickým sorbentem, které mohou současně zpracovávat až 96 vzorků během cca 2 minut (169).

Za účelem možnosti zpracování větších objemů vzorků a k usnadnění jejich nasávání/vytlačování přes monolitický sorbent představili Liang a Chen tzv. „oil-in-water emulsion“ techniku přípravy speciálních monolitických sorbentů (170). Do

předpolymerační směsi se přidávají různé kuličky, např. titanové či zirkoniové částice, které pozitivně ovlivňují vlastnosti syntetizovaných polymerních sorbentů a které v závěru interagují s cílovými analyty a vedou k jejich vysoce selektivnímu zakoncentrování.

Blomberg (171) sepsal přehledový článek týkající se využití monolitických sorbentů navázaných do polypropylenových pipetovacích špiček. Technika byla dále použita např. k extrakci amfetaminu a metamfetaminu z plazmy a moči (172, 173), ropivakainu z plazmy (174), pindololu a metoprololu z plazmy (175), vitamínu D3 z lidského séra (176), či benzodiazepinů z moči (177).

2.6.2.4. Chip-based microextraction (Mikroextrakce na čípech)

V dnešní době je žhavým tématem, zejména pro celkovou genetickou analýzu, vývoj kompletně integrovaných mikrofluidních systémů nazývaných „lab-on-a-chip“. Tento mikrosystém je schopen provést najednou více analytických postupů. Např. pro miniaturizované genetické analýzy je to izolace nukleové kyseliny, polymerázová řetězová reakce (PCR) a elektroforetická separace získaných produktů. Zavádění čipů vede k výrazné redukci celkového času analýzy, pracnosti zpracování vzorku, množství potřebného biologického materiálu, ceny analýzy či rizika kontaminace vzorku během analýzy. Výzkum mikrofluidních zařízení se v současné době soustředí zejména na bioanalýzu. Nejobtížnější fází této technologie je návrh konstrukce čipu a použití vhodných materiálů. S výhodou se zde využívají monolitické materiály (178).

Použití monolitických materiálů v mikrofluidních zařízeních je výhodné zejména pro jejich velký povrch, který poskytuje dostatek interakčních míst pro extrakci (179). Uplatňují se jak polymerní monolity, tak i ty na bázi silikagelu, které mohou být ještě různě modifikovány. Silikagelový monolit byl použit k izolaci/extrakci DNA např. z lidské krve či mozkomíšního moku (180). Polymerní monolity byly použity např. k extrakci DNA z bakterií (181, 182) či k purifikaci a frakcionaci proteinů (183).

Ukazuje se, že mikroextrakce na čipu je a bude široce použitelnou technikou k izolaci, purifikaci a zakoncentrování zejména velkých makromolekul jako nukleových kyselin a proteinů, nadějně však působí i vývoj této technologie pro izolaci malých molekul z biologických materiálů. V této oblasti byla dosud mikroextrakce na čipu použita např. k zakoncentrování dobutamin hydrochloridu ze séra (184), isoniazidu z plazmy (185) či imipraminu z moči (186).

2.6.2.5. Microextraction by/with packed sorbent/syringe (MEPS, Mikroextrakce tuhou fází)

Jedná se o moderní mikroextrakční techniku přípravy vzorku, poprvé představenou Abdel-Rehimem (187), která vznikla miniaturizací tradiční SPE. MEPS tak pracuje s objemy v řádech mikrolitrů, na rozdíl od mililitrů u SPE. Princip této techniky spočívá rovněž v sorpci analytu na pevný sorbent, který je umístěn zpravidla v jehle injekční mikrostříkačky, případně mezi injekční mikrostříkačkou a jehlou v podobě patrony. Následuje vymytí rušivých balastních látek, zakoncentrování sledovaných analytů a poté jejich eluce do chromatografického systému.

Zařízení pro MEPS se skládá z MEPS mikrostříkačky (používá se plynotěsná injekční mikrostříkačka o objemu 100 nebo 250 μl) a jehly s tzv. BIN (Barrel Insert and Needle Assembly), což je ocelová jehla s malou patronou, naplněnou různými typy sorbentů (např. silikagelem modifikovaným C18, C8 či C2 funkčními skupinami; monolitickým materiálem; RAM či MIPs). V současné době je na trhu mnoho jehel s BIN, s různými SPE fázemi, od různých výrobců, v provedení pro LC i GC aplikace (188).

Extrakce na MEPS se provádí následovně: kapalný vzorek je mikrostříkačkou opakovaně natažen/vypuzen přes patronu se sorbentem, kde dojde k zachycení analytů. Následuje promývání sorbentu vhodnou promývací fází (obvykle 20 – 50 μl), aby došlo k odstranění balastních a dalších interferujících látek. Analyty jsou poté eluovány malým objemem (zpravidla 20 – 50 μl) organického rozpouštědla (např. methanolu, acetonitrilu) či LC mobilní fází, stlačením pístu mikrostříkačky, přímo do injektoru chromatografického zařízení. Díky tomu, že stačí použít opravdu malý objem elučního činidla, nedochází ke zbytečnému naředění extrahovaných analytů.

Životnost MEPS je garantována na 40 – 100 vzorků biologického materiálu, někteří autoři však uvádějí více než 100 vzorků plazmy nebo moči a více než 400 vodných vzorků. Životnost samozřejmě závisí zejména na typu matrice vzorku, ale také na objemech zpracovávaných vzorků. Složité matrice mohou mít za následek změny povrchu sorbentu a sorpčních vlastností pevné fáze (189). Oproti SPE sorbentům, které jsou plánovány na jedno použití, je životnost MEPS vynikající. Malé množství MEPS fáze v jehle s BIN lze mezi jednotlivými vzorky jednoduše a účinně promývat, aby se zabránilo kontaminaci. V porovnání s tradiční SPE je toto promývání u MEPS mnohem jednodušší a spotřebovává se při něm minimum organických rozpouštědel.

K hlavním výhodám této techniky oproti SPE patří významné zkrácení času přípravy vzorku (1 – 2 min.), výrazné snížení spotřeby organických rozpouštědel i spotřeby vzorku (v řádech mikrolitrů), dále vysoká přesnost, citlivost, selektivita, možnost plné automatizace, případně i on-line spojení s chromatografickými zařízeními bez nutnosti jakékoli jejich úpravy. MEPS mohou být spojeny on-line jak s LC (190, 191), tak i s GC (192). Všechny kroky přípravy vzorku jsou prováděny pomocí jedné stříkačky. Technika je vhodná zejména ke zpracování vzorků biologického materiálu, neboť ani u těchto komplexních maticí s vysokým obsahem balastních látek nevyžaduje žádnou předúpravu vzorku. Ve srovnání se SPME na vláknech je tato technika výrazně robustnější, oproti SBSE vyžaduje řádově kratší dobu zpracování vzorku (193).

Technika MEPS se v současné době používá zejména v bioanalýze k extrakci celé řady léčiv z tělních tekutin, například lokálních anestetik z lidské plazmy (192), remifentanilu z plazmy (194), risperidonu a 9-hydroxyrisperidonu z lidské plazmy, moči a slin (195), atorvastatinu a jeho metabolitů ze séra (196) či antidepresiv z lidské plazmy (197).



Obr. 20 Mikroextrakce tuhou fází (188)

2.6.2.6. Solid phase dynamic extraction (SPDE, Dynamická extrakce na pevnou fázi)

SPDE je technika dynamické extrakce na pevnou fázi, která pokrývá vnitřní povrch ocelové jehly, připevněné k plynotěsné injekční stříkačce. Byla vyvinuta firmou Chromtech v roce 2000, později byla automatizována, takže umožňuje plnou automatizaci nejen extrakce, ale i desorpce a nadávkování do GC. Jedná se opět o alternativu SPME na vláknech, která má odstranit její základní nedostatky, jako je fragilita vlákna, špatná ochrana sorbentu umístěného na vláknech z vnějšku a malá extrakční kapacita způsobená omezenou plochou i tloušťkou vrstvy sorbentu. Objem stacionární fáze je u SPDE přibližně 6 krát větší než u SPME na vláknech. V praxi byla SPDE poprvé použita Lipinskim k analýze pesticidů ve vodných vzorcích (198).

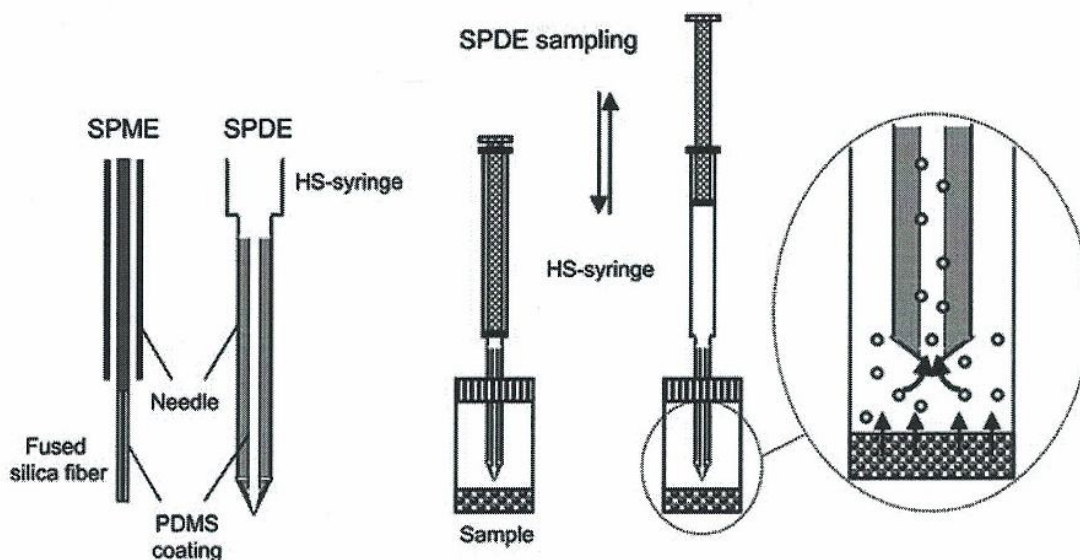
Nejdůležitější součástí celé techniky je speciální jehla, tzv. magic needle, z nerezové oceli (zpravidla 8 cm dlouhá), pokrytá zevnitř 50 µm vrstvou sorbentu. K dispozici je mnoho sorbentů, nepolárních i polárních, které mohou být použity v různých tloušťkách. Nejčastěji se používá polydimethylsiloxan (PDMS), polyethylenglykol a divinylbenzen. Životnost SPDE jehly je v průměru 1500 nástřiků, závisí však samozřejmě na typu matrice analyzovaných vzorků. Čím čistší vzorek, tím delší životnost jehly (199, 200).

Postup SPDE spočívá v opakovaném natažení a následném vytlačení vzorku do/z plynotěsné stříkačky přes vrstvu sorbentu, pokrývajícího vnitřní stěnu jehly, čímž dojde k zadržení analytů stacionární fázi. Opakovaným pohybem pístu stříkačky dojde k zakoncentrování analytů na sorbentu, ty jsou poté tepelně desorbovány do injektoru GC. Během extrakce může probíhat v zařízení i tzv. on-coating derivatizace (201).

Technika je vhodná pro analýzu kapalných a plyných vzorků. Teoreticky může být použita v uspořádání direct-immersion (přímé ponoření jehly do roztoku kapalného vzorku) i v uspořádání headspace. Většina dodnes publikovaných prací se však týká pouze headspace uspořádání. Direct-immersion lze použít pouze pro čisté vzorky, vzorky s komplexními maticemi mohou nenávratně ucpat jehlu (202).

Mezi hlavní výhody SPDE patří plná automatizace procesu extrakce, desorpce a nadávkování do GC. Moderní zařízení pro SPDE umožňují kontrolu všech extrakčních parametrů, jako je teplota vzorku, rychlost průtoku vzorku přes fázi, počet dynamických extrakcí uvnitř jehly, čímž se dosahuje výrazně lepší reprodukovatelnosti v porovnání s manuálními technikami přípravy vzorku. Další výhodou je kratší doba extrakce a dlouhotrvající dynamický kontakt vzorku s pevnou fází (dáno počtem pohybů pístu). V porovnání se SPME na vlákne má SPDE výrazně vyšší kapacitu (dáno větším objemem sorbentu), vyšší citlivost a selektivitu. Systém je výrazně robustnější. Spotřeba organických rozpouštědel je minimální. Prakticky jedinou nevýhodou SPDE je omezená komerční dostupnost jehel a zatím pouze headspace uspořádání (200).

Technika SPDE se využívá ke zpracování vzorků zejména z oblasti životního prostředí a v toxikologii. Dosud byla použita např. při stanovení amfetaminů z vlasů (203), kanabinoidů z vlasů (204) či gama-hydroxymáselné kyseliny v séru a v moči (205).



Obr. 21 Dynamická extrakce na pevnou fázi (201)

2.6.2.7. Monolith spin extraction (Monolitická rotační extrakce)

Tento typ extrakce řadí někteří autoři (137) mezi SPME techniky. Dle mého názoru však spotřebou organických rozpouštědel, vzorku i konstrukcí a provedením mezi SPME nepatří.

Jedná se o moderní techniku přípravy vzorku, která byla představena Namerou a kol. (206) v roce 2008. Technika se liší od jiných extrakčních metod především způsobem provedení. Monolitická rotační extrakce je prováděna podobně jako tradiční SPE, pouze s rozdílem, že hnací silou zde není vakuum, ale centrifugace. Jako extrakční sorbent je využíván monolitický materiál, který je pro své vlastnosti zvláště vhodný k analýze biologických vzorků (207).

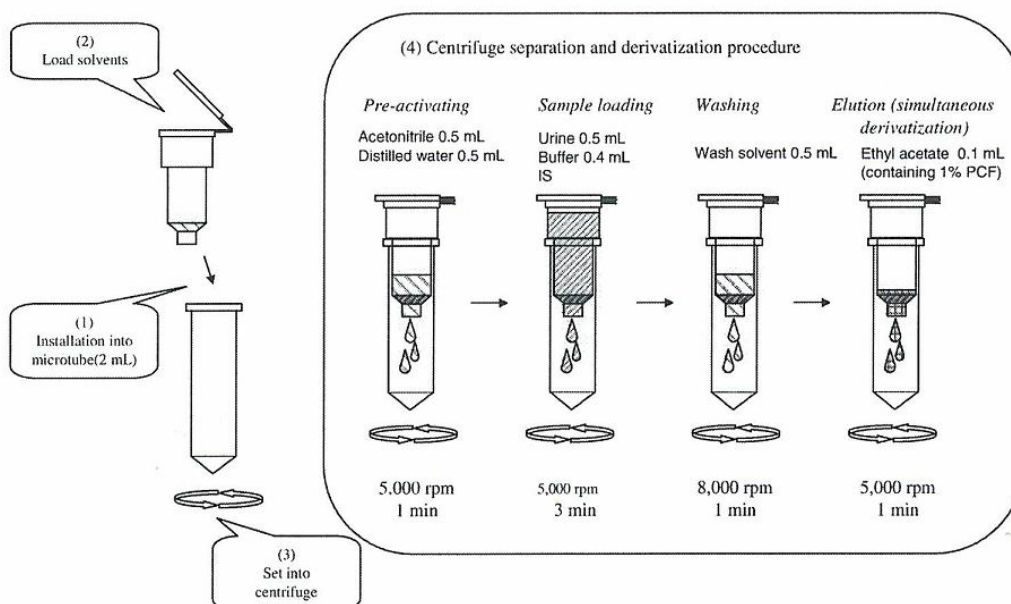
Samotná extrakce probíhá tak, že se kolonka naplněná monolitem vloží do plastové zkumavky a s ní do centrifugy. Nejprve se provede kondicionace sorbentu přidávkem daného objemu organického rozpouštědla, poté je provedena centrifugace. Následuje kondicionace přidávkem daného objemu destilované vody a opět centrifugace. Poté se na kolonku nanese vzorek a následuje opět centrifugace. Pokračuje se promýváním sorbentu promývacím roztokem a další centrifugací. Poté je plastová zkumavka vyměněna za čistou a nastává eluce zadržených analytů přidávkem přesného objemu eluční fáze a další centrifugací, takže eluent zůstane na dně zkumavky (208).

Extrakční podmínky lze snadno měnit počtem otáček centrifugy a dobou centrifugace. Zvýšením počtu otáček lze dobu centrifugace, resp. celé extrakce zkrátit.

Počet otáček lze navíc měnit i během jednotlivých kroků extrakce, čímž lze jednoduše kontrolovat rychlost průtoku kapalin přes kolonku. Důležité je snížit rychlost průtoku při nanášení vzorku na kolonku, protože jedině tak dojde k dostatečnému zadržení analytů v sorbentu a stejně tak při eluci zadržených analytů vhodným elučním činidlem.

Tato technika je jednoduchá na provedení, rychlá, málo pracná pro analytika, má relativně nízkou spotřebu organických rozpouštědel i vzorku. Eluent může být přímo nadávkován do chromatografického systému, bez nutnosti odpařování rozpouštědla.

Jako sorbent se pro přípravu vzorků biologického materiálu k analýze pomocí monolitické rotační extrakce nejčastěji používá silikagelový monolit modifikovaný C18 funkčními skupinami, jako např. při stanovení amfetaminu a methyldioxyamfetaminu z moči (206). Technika byla dále v praxi použita k extrakci dibukainu a nafazolinu ze séra (209) či amitrazu a jeho metabolitů rovněž ze séra (210).



Obr. 22 Monolitická rotační extrakce (208)

2.6.2.8. Stir bar sorptive extraction (SBSE, Sorpční extrakce na míchadle)

Tato extrakční technika, vyvinutá Baltussenem a kol. (211) v roce 1999, pracuje na stejném principu jako SPME na vlákně. Byla však navržena tak, aby odstranila její hlavní nevýhodu, kterou je omezená extrakční kapacita, způsobená malým množstvím sorbentu na vlákně. Zde je použito skleněné magnetické míchadlo, které je pokryto v porovnání se SPME vláknem výrazně větším množstvím (50 – 250 krát) sorpční extrakční fáze, nejčastěji polydimethylsiloxanem (PDMS). Nedávno byly testovány i

další materiály jako sorbenty pokrývající magnetické míchadlo, např. RAM (212) a zejména monolity (213).

Extrakce analytů z vodného vzorku do extrakčního média je řízena hodnotou rozdělovacího koeficientu. Pro soustavu nepolárního PDMS a vodného roztoku vzorku koreluje tento rozdělovací koeficient s distribučním koeficientem oktanol-voda. Z toho plyne, že je tato technika vhodná pro extrakci nepolárních, případně málo polárních látek. U polárnějších látek je jednou z možností in-situ derivatizace, která probíhá současně se SBSE, dosažená výtěžnost extrakce však často není ideální (214). Druhou možností je použití tzv. „dual phase twisters“, což jsou speciálně upravená míchadla s vnitřní dutinou naplněnou aktivním uhlím jako adsorbentem, která popsali Bicchi a kol. (215) a u nichž se prokázalo výrazné zlepšení výtěžnosti pro polární analyty.

Samotná extrakce probíhá tak, že je magnetické míchadlo pokryté vrstvou PDMS ponořeno do roztoku vzorku, který je jím míchán po dobu 30 – 240 minut. Doba extrakce je závislá zejména na objemu vzorku, velikosti míchadla (resp. množství sorbentu), rychlosti míchání, typu matrice vzorku a na extrahovaném analytu. Podmínky musí být samozřejmě optimalizovány pro každé použití. Po navázání cílových analytů na sorbent je míchadlo ze vzorku vyjmuto a jemně otřeno. Desorpce/eluce zadržovaných analytů z míchadla je buď termální pro spojení s GC či rozpouštědlem pro spojení s LC. Následně jsou extrahované analyty kvantitativně převedeny do analytického systému (216).

Mezi hlavní výhody SBSE patří vysoký koncentrační faktor, jednoduchost provedení a malá spotřeba organických rozpouštědel. Oproti SPME na vlákne má SBSE opět vyšší citlivost a lepší opakovatelnost (70).

Hlavní nevýhodou SBSE je dlouhá doba trvání extrakce, obvykle 30 – 240 minut, což dělá techniku nepraktickou pro rutinní laboratoře s velkým počtem zpracovávaných vzorků. Dále je to problém s automatizací, zejména s vyjmutím magnetického míchadla z roztoku vzorku. Nevýhodou je také, že v současné době jsou komerčně dostupná pouze míchadla pokrytá PDMS, která nejsou vhodná pro extrakci polárních analytů (216).

Technika SBSE se v praxi používá k přípravě vzorků v bioanalýze, např. při stanovení barbiturátů, benzodiazepinů a jejich metabolitů v moči a krvi (214), antidepresiv v plazmě (217) či diklofenaku v moči (218).

2.6.2.9. Extrakce pomocí large particle supports (LPS, Materiály s velkými částicemi)

Tato extrakční technika využívá tzv. materiály s velkými částicemi (LPS), které byly vyvinuty speciálně pro on-line extrakci přímo v chromatografickém systému a umožňují přímý, opakovaný nástřik neupraveného vzorku např. biologického materiálu do systému. Díky své struktuře dovolují tyto sorbenty použít velké průtoky mobilní fáze bez nárůstu zpětného tlaku na předkoloně, kde dochází k turbulentnímu toku mobilní fáze. Technika je proto často nazývána také „turbulent flow chromatography“ (TFC, chromatografie s vířivým tokem) a byla poprvé představena v roce 1997 (219).

Materiály s velkými částicemi jsou naplněny do předkolon, které se zapojují přes vícecestný přepínací ventil do chromatografického systému. Tvoření turbulentního toku v náplňových kolonách závisí na velikosti částic a na rychlosti toku mobilní fáze. Zde se běžně používají krátké úzké kolonky plněné sorbenty s částicemi o velikosti 50-60 μm , které zároveň udržují přijatelný zpětný tlak v systému i při průtokových rychlostech 4-5 ml/min. (220).

Vzorek tedy nemusí být před analýzou nijak upravován, maximálně může být centrifugován, naředěn či filtrován, poté je vložen do autosampleru, nadávkován do chromatografického systému a tokem promývací mobilní fáze nanesen na extrakční předkolonu plněnou LPS. Vířivým tokem mobilní fáze jsou malé molekuly cílových analytů rozptýleny více než makromolekuly (proteiny, lipidy) a jsou vháněny do pórů sorbentu, kde jsou zadržovány hydrofóbními interakcemi. Kvůli vysokému průtoku mobilní fáze jsou velké molekuly matrice vzorku unášeny do odpadu a nemají možnost se zadržet v pórech sorbentu. Po přepnutí přepínacího ventilu jsou zadržené analyty eluovány ze sorbentu extrakční předkolony tokem analytické mobilní fáze na analytickou kolonu k separaci a následně do detektoru k detekci. Technika se používá nejčastěji ve spojení s HPLC (221, 222).

Jedná se o jednoduchou, rychlou, vysoce výkonnou techniku přípravy vzorku, která výrazně zkracuje dobu jeho přípravy k analýze, snižuje spotřebu organických rozpouštědel a náročnost zpracování. V on-line zapojení extrakční předkolony do chromatografického systému může být veškerý eluát přenesen na separační kolonu, na rozdíl od tradičních off-line extrakčních technik, kde je do analytického systému nadávkována zpravidla pouze jeho část. Díky tomu dosahují on-line techniky mnohem vyšší citlivosti, hrozí zde však nebezpečí přetížení analytické kolony (223).

Jednou z nevýhod této techniky je omezená životnost extrakční kolony. K prodloužení její životnosti je nutné používat vhodné promývací a mobilní fáze. Bylo dokázáno, že životnost prodlužuje používání např. 15 % kyseliny octové a 90 % tetrahydrofuranu. Kyselina octová jako mobilní fáze odstraňuje proteiny, roztok tetrahydrofuranu lipidy z extrakční i analytické kolony. Jejich používáním bylo dosaženo životnosti extrakční předkolony plněné LPS až 2000 nástřiků biologického materiálu (222).

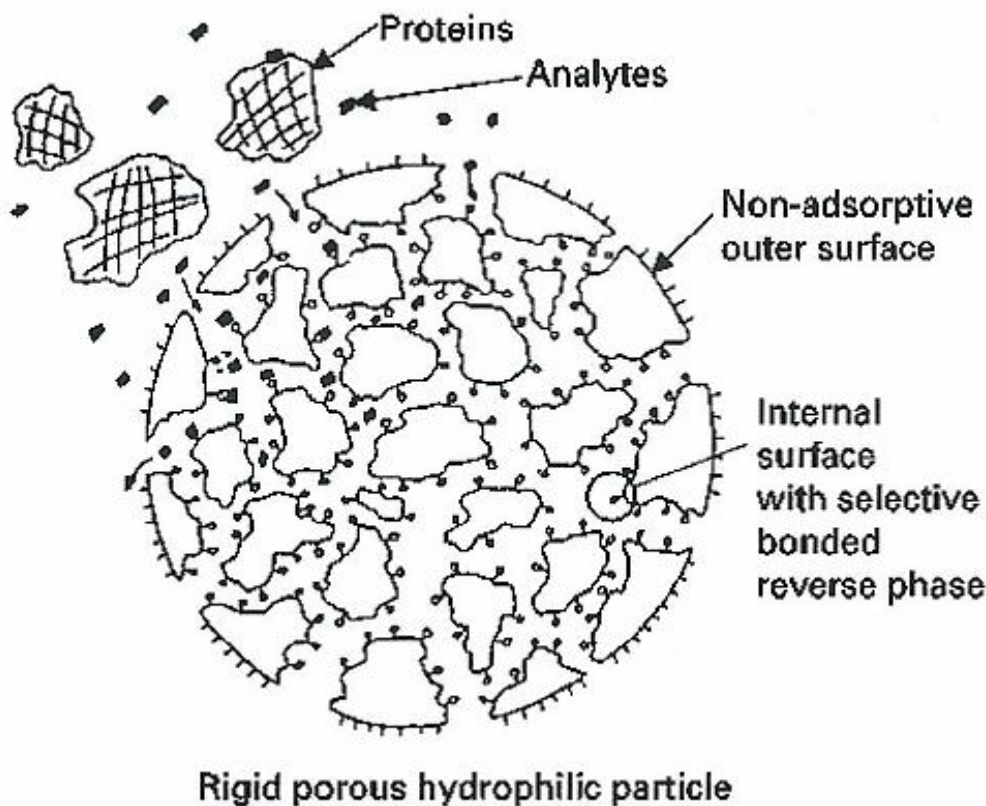
Extrakce pomocí LPS se v praxi používá nejčastěji k analýze léčiv a jejich metabolitů v biologickém materiálu, např. při stanovení antidiabetika sitagliptinu v lidské moči a hemodialyzátu (224), methadonu a jeho metabolitů v plazmě (225), tricyklických antidepresiv v séru (226), busulfanu v séru a plazmě (227) či antitusika dextromethorphanu a jeho metabolitů v plazmě (228).

2.6.2.10. Extrakce pomocí restricted-access materials (RAM, Materiály s omezeným přístupem)

Další skupinou extrakčních materiálů, určených k on-line extrakci přímo v chromatografickém systému, jsou tzv. materiály s omezeným přístupem (RAM). Tyto sorbenty byly vyvinuty speciálně pro extrakci látek s nízkou molekulovou hmotností (např. léčiv a jejich metabolitů) v komplexních matricích (např. biologických materiálech) obsahujících vysokomolekulární látky (zejména proteiny). Tyto materiály umožňují přímý a opakovaný nástřik vzorku do průtokového analytického systému bez jeho předchozí úpravy. Slouží zejména k automatizaci extrakce, k purifikaci a zakoncentrování stanovovaných analytů (229).

RAM materiály jsou plněny do speciálních kolonek a jsou navrženy tak, aby zachytily nízkomolekulární analyty uvnitř pórů a naopak odstranily makromolekuly, jako jsou proteiny. Interakční místa uvnitř pórů jsou přístupná pouze pro malé molekuly, které jsou zadrženy tradičními retenčními mechanismy, jako jsou hydrofóbní a elektrostatické interakce. Makromolekuly jsou odstraněny buď pomocí fyzikálních bariér (velikost pórů), nebo pomocí chemických bariér, které představují hydrofilní funkční skupiny na povrchu sorbentu, nebo polymerní sítě kovalentně vázané na povrch stacionární fáze, které rovněž brání precipitaci proteinů. Na separaci se tedy uplatňují dva principy – princip gelové chromatografie pro makromolekuly (separace na základě velikosti molekul) a princip adsorpční nebo iontově výměnné chromatografie (separace

na základě interakcí malých molekul se stacionární fází). Schematická struktura a funkce materiálu s omezeným přístupem je znázorněna na obr. 23.



Obr. 23 Schematická struktura materiálu s omezeným přístupem (230)

V současné době jsou dostupné různé RAM sorbenty, které se liší charakterem bariéry a strukturou povrchu. Rozlišujeme 5 základních skupin RAM: 1. vícefunkční a dvouvrstvé fáze (Mixed-functional and Dual Zone Phases), 2. materiály s vnitřním hydrofóbním povrchem (Internal Surface Reversed-Phase Packings), 3. stíněné hydrofóbní fáze (Shielded Hydrophobic Phases), 4. semipermeabilní povrchy (Semipermeable Surfaces), 5. polymerní materiály (Polymeric Materials) (221).

2.6.2.10.1. Vícefunkční a dvouvrstvé fáze

Vícefunkční RAM, poprvé představené Kandou a kol. (231) v roce 1994, mají stejné vlastnosti vnitřního i vnějšího povrchu. Oba povrchy jsou tvořeny hydrofilními, nejčastěji polyoxyethylenovými a hydrofóbními např. styrenovými funkčními skupinami, vázanými na silikonový polymer, pokrývající porézní silikagel. Dlouhé, náhodně rozmístěné hydrofilní polyoxyethylenové řetězce limitují přístup

makromolekul, jejich odstranění z povrchu dále napomáhá malý průměr pórů použitého silikagelu (232). Jako hydrofóbní skupiny jsou k dispozici kromě styrenových také skupiny C8, fenyl či silný iontoměnič (SCX). Malé analyty jsou zadrženy vazbou na hydrofóbní či iontovýměnné skupiny.

U dvouvrstevných RAM se využívají dvě různá aktivní centra jedné funkční skupiny – hydrofilní části na povrchu a hydrofóbního řetězce uvnitř funkční skupiny (233). Jedním z příkladů těchto sorbentů je diolová stacionární fáze. Ethandiolové konce funkčních skupin tvořících hydrofilní vrstvu znemožňují přístup proteinům k vnitřní stacionární fázi, zatímco metoxypropylové řetězce kryté diolovou vrstvou slouží k zachycení nízkomolekulárních analytů.

2.6.2.10.2. Materiály s vnitřním hydrofóbním povrchem (ISRP)

Tyto RAM, představené Hagestamem a Pinkertonem (234) již v roce 1985, jsou charakterizovány dvěma typy povrchů, dvěma typy vázaných funkčních skupin. Zatímco na vnějším povrchu sorbentu je hydrofilní fáze, vnitřní povrch pórů sorbentu váže hydrofóbní anebo iontově výměnné skupiny (235). Jedná se o fyzikální bariéru, neboť pro oddělení makromolekul je rozhodující velikost pórů sorbentu. Malé molekuly, jež jsou schopny proniknout dovnitř do pórů, se separují na základě hydrofóbních interakcí s vnitřním povrchem. Naopak přístupu makromolekul k hydrofóbním skupinám brání velikost pórů.

Přípravy těchto materiálů jsou založené na enzymatickém odbourávání hydrofóbních funkčních skupin vázaných na vnějším povrchu silikagelu, zatímco vnitřní povrch je díky velikosti pórů před enzymem chráněn. Jako enzymy se nejčastěji používají pankreatická lipáza či esteráza (235).

Prvním ISRP RAM je tzv. GFF sorbent. Jeho základem je silikagel s velikostí pórů 8 nm. Vnitřní, hydrofóbní povrch tvoří v tomto případě tripeptid glycin-fenylalanin-fenylalanin (GFF). Na vnějším povrchu jsou vázány hydrofilní diol-glycinové funkční skupiny. Velké makromolekuly (např. proteiny) jsou mobilní fází eluovány do odpadu, zatímco malé molekuly (např. léčiva) jsou zadrženy uvnitř pórů tripeptidovou fází (236). Retenční mechanismus je způsoben převážně interakcí π -elektronů. Navíc volná karboxylová skupina koncového fenylalaninu vykazuje slabé iontoměničové vlastnosti.

Nejoblíbenějším ISRP RAM je tzv. alkyl-diol-silica (ADS). Jedná se o nejpopulárnější RAM vůbec. Je vyráběn od počátku 90. let minulého století. Využívá silikagel s velikostí pórů 6 nm, na jehož vnější povrch jsou vázány hydrofilní funkční skupiny, např. glycerylpropyl- či diol. Vnitřní povrch pokrývají reverzní fáze C4, C8 nebo C18, u novějších ADS materiálů to bývají také iontovýměnné skupiny, např. kyseliny sulfonové (237).

2.6.2.10.3. Stíněné hydrofóbní fáze (SHP)

Tento typ RAM představili Gisch a kol. (238) v roce 1988. Jeho základem je silikagelový nosič, na který je kovalentně vázán hydrofilní polyethylenglykolový či polyethylenoxidový polymer. Tento hydrofilní polymer vytváří síť, do které jsou inkorporovány hydrofóbní, např. fenylové skupiny. V tomto případě se jedná o stacionární fázi s chemickou bariérou - hydrofilní polyethylenglykolová síť stínící hydrofóbní fenylové skupiny zabraňuje průniku proteinů, zatímco malé molekuly projdou skrz polymerní vrstvu a interagují s hydrofóbními skupinami uvnitř polymerní sítě. Tento materiál je s výhodou používán především pro zakoncentrování a separaci sloučenin s fenylovou skupinou v molekule (239).

2.6.2.10.4. Semipermeabilní povrchy (SPS)

Tento typ RAM vyvinuli Desilets a kol. (229) poté, co objevili, že hydrofilní polymer, např. polyoxyethylenový či polyethylenglykolový, vázaný na povrchu reverzní fáze (nejčastěji C4, C8, C18, nitril či fenyl), vytváří semipermeabilní hydrofilní vrstvu, která brání přístupu proteinů k hydrofóbní stacionární fázi, navázané uvnitř pórů silikagelu. V tomto případě je to opět chemická bariéra, která brání přístupu proteinů k hydrofóbní fázi. Tato bariéra (hydrofilní polymer) je k chemicky vázané hydrofóbní fázi ukotvena nejčastěji kovalentně, což zabraňuje postupnému vymývání polymerní vrstvy (240).

Vnější hydrofilní povrch odpuzuje velké molekuly, jako jsou proteiny, zatímco vnitřní povrch, tvořený různými typy hydrofóbní fáze váže malé analyty, které pronikly skrz polymerní vrstvu.

Jedním z nejnovějších typů RAM, patřících mezi SPS, je C8 či C18 stacionární fáze pokrytá kovalentně vázaným kyselým α -glykoproteinem (AGP), což je hydrofilní protein, který poměrně dobře snáší přítomnost organických rozpouštědel v mobilní fázi. Tento materiál pracuje opět na principu chemické difúzní bariéry, stejně jako starší SPS

materiály, pouze s tím rozdílem, že místo polymeru vytváří vnější, hydrofilní povrch proteinová síť. Proto se tento typ materiálu, představený Hermanssonem a Grahnem v roce 1994 (241), někdy nazývá proteinem pokrytý silikagel. Jeho výhodou je především možnost pracovat v širším rozmezí pH (od 2 do 10).

2.6.2.10.5. Polymerní materiály

Posledním typem RAM jsou speciální polymerní materiály, plněné do kolonek o rozměrech nejčastěji 10 x 2 mm či 10 x 4 mm, které je opět možné zapojit do chromatografického systému pomocí column-switching a využít tak k on-line extrakci. Velikost částic těchto materiálů bývá nejčastěji kolem 30 μm a maximální průtoková rychlost může dosahovat až 3 ml/min. Jejich hlavní výhodou je stabilita v širokém rozsahu pH a to od 2 do 12. Samozřejmostí je odolnost vůči organickým rozpouštědlům a pufrům až do koncentrace 0,3 mol/l. Maximální tlak na kolonce by neměl překročit 10 MPa. Často umožňují zakoncentrovat zároveň hydrofóbní i hydrofilní analyty, které jsou zadrženy v pórech polymeru. Látky o vysoké molekulové hmotnosti (např. proteiny) jsou odstraněny na základě velikosti pórů. Používají se nejčastěji k on-line přípravě vzorků biologického materiálu k analýze léčiv a jejich metabolitů (242).

Všechny typy RAM sorbentů jsou plněny do ocelových či plastových kolon, které umožňují jejich snadné zapojení do průtokového analytického systému. Nejčastější je jejich zapojení do systému HPLC, lze je však začlenit také do neseparačních průtokových systémů průtokové injekční analýzy (FIA, Flow Injection Analysis), nebo sekvenční injekční analýzy (SIA, Sequention Injection Analysis) (243). Do analytického systému mohou být zapojeny buď tzv. režimem přímého provedení (single column) nebo častěji tzv. systémem přepínání kolon (column-switching).

Režim přímého provedení („single column“) spočívá v zapojení kolony naplněné RAM do systému místo analytické (separační) kolony. V tomto případě je neupravený vzorek (např. vzorek biologického materiálu) dávkován autosamplerem přímo do proudu mobilní fáze a na koloně plněné RAM dochází nejprve k separaci makromolekul od nízkomolekulárních analytů a poté k separaci jednotlivých analytů podle jejich retence v sorbentu. Postupně dochází k eluci všech složek vzorku z předkolony plněné RAM do detektoru. Ihned po obnovení rovnováhy RAM může být nadávkován další vzorek. Základním požadavkem je použití mobilní fáze s nedenaturujícími vlastnostmi, tedy s obsahem menším než 25 % acetonitrilu, 20 % isopropanolu a 10 %

tetrahydrofuranu. Tyto hodnoty charakterizují počátek denaturace proteinů, v praxi se proto nepoužívá obsah organické fáze vyšší než 20 % (v/v). Tato omezení, týkající se mobilní fáze, však výrazně zmenšují rozsah použitelnosti tohoto uspořádání, protože analyt musí mít za daných podmínek vhodnou retenci na koloně. Výhodou jsou nízké nároky na přístrojové vybavení a skutečně přímá analýza biologických vzorků. Kolona plněná RAM v tomto případě plní jak extrakční, tak separační funkci (244, 245).

Mnohem častější je použití RAM ve vícekolonových chromatografických systémech, využívajících techniku přepínání kolon. Tyto systémy umožňují simultánní odstranění proteinů a zakoncentrování analytů na extrakční předkoloně plněné RAM, zatímco samotná separace nízkomolekulárních analytů probíhá na analytické (separační) koloně s běžným typem sorbentu a libovolnou mobilní fází. Omezení se v tomto případě kladou pouze na promývací mobilní fázi, do které se dávkuje biologický vzorek, která opět nesmí být denaturační. Podle následného směru toku analytické mobilní fáze přes předkolonu rozlišujeme konfiguraci “straight-flush” a “back-flush” (budou podrobně probrány v kapitole 2.6.4.). Kolona plněná RAM slouží v tomto uspořádání pouze k extrakci, zadržení a zakoncentrování stanovovaných analytů, k jejichž separaci dojde až na analytické koloně, na kterou jsou z extrakční předkolony přeneseny analytickou mobilní fází (246).

Mezi hlavní výhody použití RAM patří jednoduchost a rychlost analýzy, snadná automatizovatelnost, dlouhá životnost. Nejprínosnější je zapojení těchto materiálů jako extrakčních předkolon do systému HPLC prostřednictvím vícecestného přepínacího ventilu v režimu column-switching, zvláště pro analýzu velkých sérií vzorků. Díky on-line extrakci zcela odpadá jakákoli manuální příprava vzorku před analýzou, vzorek se dávkuje přímo, bez jakékoli úpravy do HPLC systému. Tím se výrazně zkracuje celkový čas analýzy, nedochází prakticky ke ztrátám analytů, práce analytika se zjednodušuje a stává se rovněž bezpečnější, zvláště jedná-li se o potenciálně infekční vzorky biologického materiálu. RAM umožňují extrakci, vyčištění a zakoncentrování cílových analytů. Oproti tradičním SPE sorbentům mají RAM delší životnost, vyšší výtěžnost extrahovaných analytů, nižší riziko chyby obsluhujícího personálu, menší spotřebu organických rozpouštědel a ve výsledku také nižší celkové náklady na jednu analýzu (246).

Materiály s omezeným přístupem jsou v současné době v praxi velice často používány, o čemž svědčí obrovské množství publikací, týkajících se jejich využití. Většina z nich se zabývá stanovením léčiv, jejich metabolitů a dalších biologicky

aktivních látek v biologickém materiálu. Další publikace se týkají využití RAM materiálů ke stanovení antidot v biologickém materiálu, k veterinárnímu stanovení léčiv, ve výzkumu k identifikaci lidských plazmatických proteinů, k výzkumu nových léčiv či k čištění plasmidové DNA. Dalšími oblastmi využití RAM jsou monitorování životního prostředí a analýza potravin. Podrobný přehledový článek týkající se této problematiky sepsali Sadílek a kol. (246).

2.6.3. SPE založená na selektivních sorbentech

V dnešní době existují speciální extrakční sorbenty, které kromě samotného zakoncentrování analytů umožňují také jejich selektivní separaci z komplexních matic, jež je rozhodující pro jejich kvantitativní a selektivní stanovení. Mezi tyto vysoce selektivní sorbenty se řadí tzv. molekulárně vtištěné polymery (MIPs), aptamery a imunosorbenty.

2.6.3.1. Molecularly imprinted polymers (MIPs, Molekulárně vtištěné/otištěné polymery)

Jedná se o speciální syntetické polymery, používané jako vysoce selektivní SPE sorbenty, které jsou schopné selektivně a specificky zadržet požadované analyty, případně jejich strukturální analoga, podle velikosti a tvaru jejich molekuly a uspořádání funkčních skupin. Jsou syntetizovány přímo podle konkrétních molekul pro které mají být použity a to tak, že jim dané molekuly vytvářejí tzv. předlohu – templát. Templát vytváří komplex s jedním či více funkčních monomerů, následuje polymerace a odstranění templátu. Výsledkem je stabilní polymer, obsahující specifické dutiny, které jsou stericke (velikost a tvar) a chemicky (uspořádání funkčních skupin) komplementární molekulám templátu a tudíž molekulám stanovovaného analytu (247).

MIPs mohou být syntetizovány třemi technikami – kovalentním imprintingem, nekovalentním imprintingem či hybridizací těchto dvou technik. V současné době se používá nejčastěji technika nekovalentního imprintingu. Pro syntézu MIPs je nejdůležitější správná volba monomeru/ů pro polymeraci, která má zásadní vliv na extrakční vlastnosti MIPs sorbentů. Měly by být vybrány takové monomery, které budou ve zvoleném rozpouštědle tvořit silné interakce, což vede ke zvýšení kapacity sorbentu a ovlivňuje to homogenitu vazebných dutin. Dále musí být směs templátu a monomerů stabilní a nepodléhat během polymerace vedlejším reakcím. Vhodnější je také použít k vytvoření dutiny sorbentu jako templát strukturální analog místo samotné

látky, pro jejíž extrakci chceme MIPs použít. Zabrání se tak tzv. „krvácení templátu“, které může nastat v případě nedostatečného vymytí templátu z čerstvě připraveného MIPs a které výrazně negativně zasahuje do kvantifikace stopových množství látek v komplexních maticích (248).

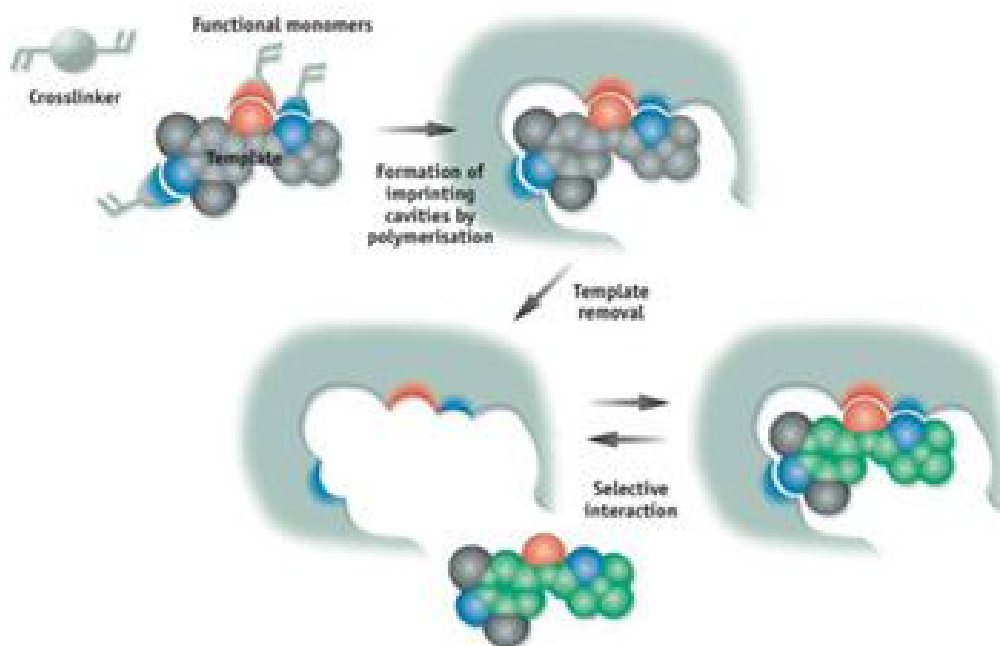
Retence analytů na sorbentu je způsobena vysoce selektivním zachycením molekuly o určité velikosti, tvaru a umístění funkčních skupin v dutinách sorbentu a následným vznikem vazebných interakcí mezi sorbentem a analytem, mezi které patří zejména vodíkové vazby a hydrofóbní interakce (249).

Extrakce využívající jako sorbenty MIPs mohou být prováděny jak v off-line, tak on-line uspořádání. Při konfiguraci on-line jsou MIPs plněny do speciálních kolonek, které jsou s chromatografickým systémem spojeny přes vícecestný přepínací ventil (250).

K hlavním výhodám MIPs patří nepochybně vysoká selektivita extrakce (na rozdíl od tradiční SPE, která postrádá schopnost selektivní extrakce analytu bez současné extrakce kontaminant), stabilita sorbentu (mohou být zahřívány, jsou stabilní v organických rozpouštědlech i v silných kyselinách a bazích), možnost opakovaného použití, snadnost a rychlost provedení extrakce, relativně nízké výrobní náklady, možnost připravit sorbent prakticky pro jakoukoli látku či možnost zpracovat libovolnou matici vzorku bez předchozích úprav (251).

Nevýhodou prvních MIPs bylo poměrně nízké zastoupení specifických vazebných míst v nasyntetizovaných sorbentech, což mělo za následek nízkou kapacitu sorbentu. Další nevýhodou je již výše uvedené tzv. krvácení templátu, způsobené jeho nedokonalým odstraněním z dutin nově nasyntetizovaného sorbentu. Tento nedostatek lze vyřešit např. použitím stabilních izotopem značených látek jako templátů pro přípravu MIPs materiálů (252), nebo zahřátím MIPs s následnou elucí silným polárním rozpouštědlem, což by mělo veškerý templát z připraveného sorbentu odstranit (253).

MIPs jako selektivní SPE sorbenty jsou v současné době hojně používány, zejména k extrakci léčiv a jejich metabolitů z biologického materiálu. V této oblasti byly MIPs použity např. při stanovení cefalosporinových antibiotik v lidské plazmě a séru (254, 255), fluorochinolonových antibiotik v lidské moči (256), sitagliptinu v plazmě a moči (257), promethazinu v plazmě (258) či tramadolu v plazmě a moči (259).



Obr. 24 Schéma přípravy molekulárně vtištěných polymerů (260)

2.6.3.2. Immunosorbents (ISs, Imunosorbenty)

Vysoce selektivní imunosorbenty jsou speciální extrakční pevné fáze s imobilizovanou specifickou protilátkou proti extrahovanému analytu, které umožňují jeho selektivní extrakci z komplexních vzorků na základě vysoce selektivní vazby antigen-protilátka. Technika je často v literatuře nazývána také imunoafinitní extrakce (IAE) (261).

Technika využívá monoklonální i polyklonální protilátky. Imunosorbenty obsahující polyklonální protilátky mohou vázat více analytů, které mají strukturu podobnou původnímu imunogenu, čehož se využívá k extrakci např. léčiv včetně jejich metabolitů. U monoklonálních protilátek se pro vývoj imunosorbentů využívá tzv. zkřížené reaktivity, která umožňuje selektivní extrakci skupiny strukturálně podobných látek. Vazba analytu na protilátku je výsledkem prostorové komplementarity a podílí se na ní spousta intermolekulárních interakcí (130).

Extrakce probíhá tak, že po nanesení vzorku na imunosorbent jsou cílové analyty specificky zadrženy vazbou na imobilizovanou protilátku. Následuje promytí sorbentu vhodnou mobilní fází, čímž se odstraní kontaminující látky. Nakonec dojde k uvolnění zadrženého analytu z komplexu s protilátkou a jeho eluci ze sorbentu, zpravidla přidavkem přesného objemu organického rozpouštědla.

Technika je vhodná zejména pro separaci látek s velkou molekulou, jako jsou hormony, peptidy, enzymy, protilátky, rekombinantní proteiny, ale také viry či subcelulární komponenty. Malé molekuly jsou totiž obvykle špatně imunogenní, proto je získávání specifických protilátek namířených proti malým molekulám výrazně obtížnější (262).

Imunosorbenty mohou být použity v off-line procedurách, kde jsou plněny do kolonek na jedno použití, anebo mohou být plněny do speciálních předkolon, které se zapojují přímo do chromatografického zařízení, zpravidla přes vícecestný přepínací ventil a umožňují extrakci on-line, což výrazně zjednodušuje manipulaci se vzorkem před analýzou. Imunosorbenty plněné do předkolon se navíc snadno regenerují a proto mohou být použity opakovaně (263).

Hlavní výhodou imunosorbentů je jejich vysoká selektivita extrakce a v případě on-line zapojení do chromatografického systému plná automatizace zpracování vzorku. Vysoká selektivita extrakčního kroku umožňuje snadnou identifikaci analytu a možnost jeho stanovení i při velmi nízké koncentraci. Jednou z hlavních nevýhod této techniky je potřeba počátečního náročného vývoje protilátky, což je nákladné. Také je zde problém s přípravou protilátek proti stanovovaným analytům s malou molekulou (např. léčiv), které nejsou dostatečně imunogenní. Dále je to fakt, že interakce analyt-protilátka může být značně ovlivněna maticí vzorku, jejíž přítomnost může vést k nízké výtěžnosti extrakce či nespecifickým interakcím (264).

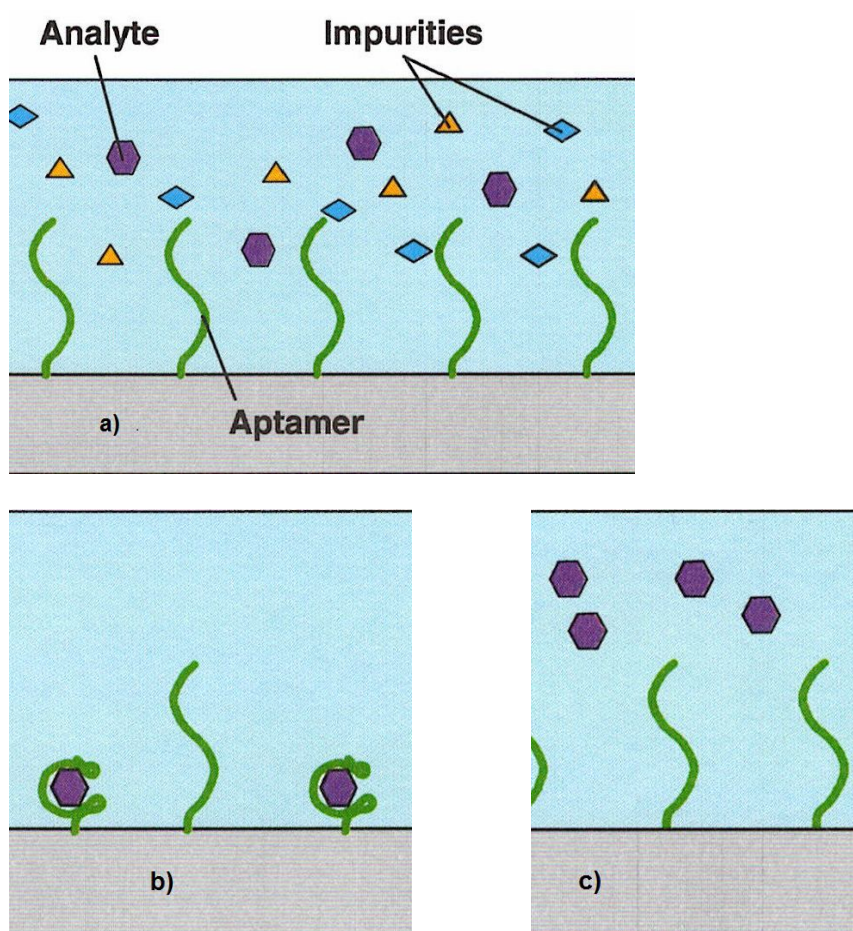
Velkou oblastí využití imunosorbentů v praxi je analýza léčiv či jiných biologicky aktivních látek ve vzorcích biologického materiálu, např. stanovení kortikosteroidů v moči (265), klenbuterolu v plazmě (266), LSD v plné krvi a moči (267) či morfinu v moči (268).

2.6.3.3. Aptamers (Aptamery)

Dalším typem afinitní extrakce, pro kterou je typická vysoce selektivní a pevná vazba mezi molekulami receptoru a ligandu, je extrakce využívající tzv. aptamery. Aptamery jsou oligonukleotidy DNA či RNA, které mohou s vysokou afinitou a specificitou vázat velké množství cílových molekul. Aptamery se někdy nazývají oligosorbenty a extrakce, která je využívá, oligoextrakce (269).

Aptamery se navrhují a syntetizují přímo pro vazbu konkrétního cílového analytu. Mezi molekulami receptoru a ligandu působí velké množství mezimolekulárních interakcí (afinitních vazeb), které vedou k vysoce selektivní

extrakci. Důležitou úlohu zde hraje hlavně geometrie obou zúčastněných složek. Při extrakci dochází k přímému začlenění extrahovaných malých molekul analytu do struktury aptameru a jejich zadržení. Vodný roztok vzorku, obsahující kromě cílového analytu také spoustu nečistot, je nanesen na sorbent s navázaným aptamerem. Při vhodné teplotě (většinou laboratorní) zachycuje aptamer cílový analyt, zatímco nečistoty jsou ze systému odstraněny. Změnou teploty pevné fáze dojde ke konformačním změnám struktury aptameru a tím k uvolnění zadrženého analytu do čisté kapalná fáze. Vracením teploty na původní hodnotu dojde k návratu struktury aptameru, což umožňuje jeho opakované použití (270, 271).



Obr. 25 Princip aptameru – a) nanesení vzorku, b) selektivní zadržení cílových analytů, c) uvolnění analytů změnou teploty sorbentu (271)

Ve srovnání s ostatními afinitními extrakčními technikami, využívajícími protilátky, mají aptamery řadu výhod. Mohou být syntetizovány k extrakci prakticky jakýchkoli analytů, jsou stabilnější při laboratorní teplotě, jejich příprava je jednoduchá, lze je snadno chemicky modifikovat k usnadnění jejich připevnění na povrch stacionární

fáze. Aptamery jsou navíc citlivé na změny teploty, čehož se využívá k elegantnímu uvolnění zadržených analytů. Mohou být použity opakovaně. Práce s nimi je velice jednoduchá a probíhá zcela ve vodném prostředí, tedy bez potřeby organických rozpouštědel, která nejsou potřeba ani v případě uvolnění zadrženého analytu ze sorbentu, ani při kondicionaci sorbentu před dalším použitím. Jedná se o vysoce selektivní typ extrakce, jehož prakticky jedinou nevýhodou je nedostatečná kapacita v současnosti připravovaných imunosorbentů (272).

Aptamery byly dosud v praxi použity pro selektivní extrakci např. kokainu z plazmy (273) a z plné krve (274).

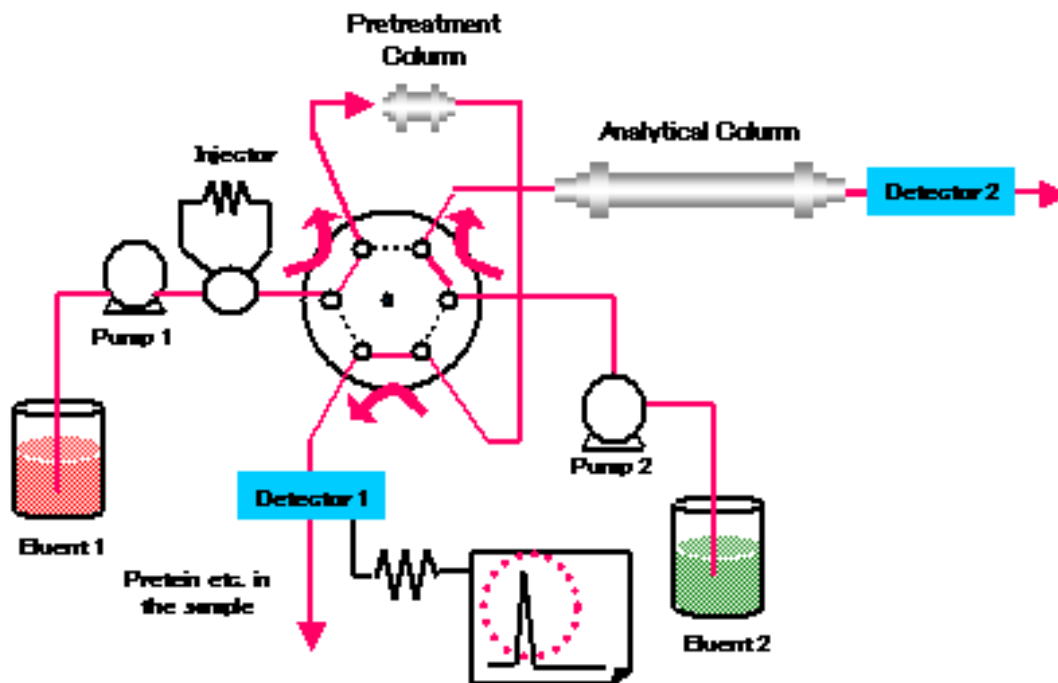
2.6.4. Column-switching (CSW, Technika přepínání kolon)

Technika přepínání kolon (column-switching) se ukázala v posledních letech jako velice progresivní a používá se zejména pro on-line extrakci a stanovení látek v komplexních matricích. Nejčastěji se používá k analýze léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách. Umožňuje přímý nástřik neupraveného vzorku do chromatografického systému bez jeho předchozích úprav. On-line extrakce a zakoncentrování analytů proběhne přímo v systému na zabudované extrakční předkoloně, plněné speciálním sorbentem (např. RAM, LPS) a zapojené do systému pomocí přepínacího ventilu. Po extrakci jsou zakoncentrované analyty přeneseny na analytickou kolonu, kde jsou separovány, následuje detekce separovaných analytů v detektoru. Dnešní HPLC zařízení jsou již většinou vybaveny vícecestným přepínacím ventilem a obsahují více pump, což jsou základní podmínky této techniky. Systém column-switching může obsahovat libovolný počet kolon, předkolon, přepínacích ventilů a pump (246, 275).

Během extrakce probíhající v systému CSW je nejprve vzorek nadávkován autosamplerem do proudu promývací mobilní fáze, která jej nanese na extrakční předkolonu. Přepínací ventil je v poloze A. Dojde k zadržení stanovovaných analytů na sorbentu v extrakční předkoloně, zatímco jsou složky nežádoucí matrice vzorku vymyty do odpadu. Během toho dochází ke kondicionaci analytické (separační) kolony průtokem analytické mobilní fáze. Následuje přepnutí ventilu do polohy B. Zadržené analyty jsou z předkolony eluovány analytickou mobilní fází na separační kolonu, kde jsou separovány a následně unášeny do detektoru. Nakonec je přepínací ventil přepnut zpět do polohy A, čímž dochází k rychlé kondicionaci předkolony promývací mobilní

fází a postupné kondicionaci separační kolony analytickou mobilní fází. Systém je tímto připraven k nástřiku dalšího vzorku.

1st step : concentration of drugs & deproteinization



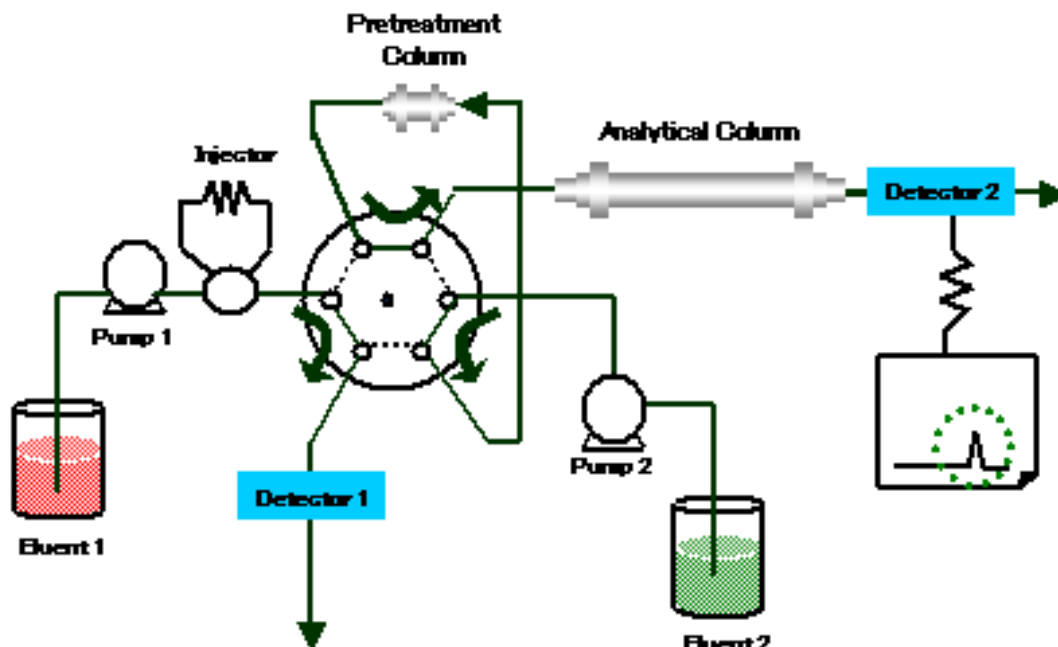
Obr. 26 Schematická struktura systému přepínání kolon – zakoncentrování analytu, deproteinace (276)

2.6.4.1. Konfigurace systému přepínání kolon

Podle směru toku analytické mobilní fáze přes extrakční předkolonu rozlišujeme 2 konfigurace CSW, tzv. straight-flush a back-flush. V konfiguraci straight-flush jsou zadržené analyty z extrakční předkolony eluovány tokem analytické mobilní fáze ve stejném směru, jakým byla předkolona promývána promývací mobilní fází za účelem odstranění nežádoucích komponent matrice vzorku. Nevýhodou tohoto uspořádání je často rozmytá zóna stanovovaných analytů. Proto se častěji používá tzv. back-flush konfigurace, u které je eluce zadržovaných analytů z extrakční předkolony prováděna analytickou mobilní fází s opačným směrem průtoku, než byl směr toku promývací mobilní fáze. Samozřejmě záleží na tom, jak hluboko v sorbentu jsou stanovované analyty zadrženy, ale protože jsou většinou zadrženy na čele předkolony, dochází u této konfigurace k menšímu rozmývání zón zakoncentrovaných cílových analytů. Navíc je v tomto případě analytická kolona chráněna před kontaminací později eluovatelnými

komponentami matrice. Naproti tomu je zde vyšší riziko poškození náplně předkolony používáním střídavého směru toku mobilní fáze (277, 278).

2nd step : Analysis of drugs



Obr. 27 Schematická struktura systému přepínání kolon – eluce analytu, analýza (276)

2.6.4.2. Parametry předkolon

V této kapitole budou zmíněny základní parametry předkolon, které mají vliv na průběh a na dosažení správných výsledků on-line extrakce. Jsou to rozměry předkolon a jejich náplně.

Použitá extrakční předkolona musí mít dostatečně vysokou adsorpční kapacitu, aby nedocházelo ke ztrátám analytů během promývacího kroku. Výběr předkolony závisí na objemu nadávkovaného vzorku a na stupni vazby analytů na proteiny. V praxi se nejvíce osvědčily sestavy, kdy je předkolona mnohem kratší než analytická kolona. Krátká předkolona je vhodná zejména z důvodu, že se minimalizuje doba potřebná k odstranění nevhodných komponent matrice. Nicméně v případě, že jsou analyty pevně vázány na proteiny, musí být délka předkolony větší. Totéž platí v případech, kdy chceme zlepšit selektivitu extrakčního procesu. Vnitřní průměr předkolony i kolony by měl být zhruba stejný, aby se minimalizoval efekt rozšiřování píků (extra-column band

broadening). Nejčastěji jsou používány předkolony s vnitřním průměrem v rozmezí 2 - 4,6 mm.

Náplně předkolon by měly mít relativně velké částice ve srovnání s analytickými kolonami, v opačném případě dochází k problémům s jejich ucpáváním. Většinou se používají předkolony s velikostí částic v rozmezí 10 – 40 μm , což poskytuje vhodnou stabilitu i sorpční kapacitu. Retenční kapacita předkolony by měla být nižší, než retenční kapacita analytické kolony. Pak dojde k zakoncentrování analytů hned v počátku, čímž se minimalizuje efekt rozmývání píků. Pro většinu biologických vzorků se používají předkolony naplněné nepolárními sorbenty, které zadržují analyty nízké nebo střední polariry, zatímco polární komponenty matrice jsou odstraněny. Mezi moderní sorbenty, navržené především pro přímý nástřik biologických tekutin do chromatografického systému, patří všechny typy RAM či LPS. V posledních letech jsou využívány rovněž vysoce selektivní imunoafinitní předkolony s imobilizovanými monoklonálními protilátkami a MIPs (279).

2.6.4.3. Parametry techniky CSW

V této části jsou popsány požadavky na složení promývací mobilní fáze, selektivita a citlivost techniky, celkový čas analýzy a možnosti zlepšení separačního procesu.

Promývací mobilní fáze musí mít nedenedaturující vlastnosti, tzn. obsah organické složky nesmí být vyšší než 20 % (v/v). Rychlost toku této fáze a doba trvání promývacího kroku musí být přesně nastaveny pro konkrétní analyty a matrice tak, aby bylo dosaženo dobré účinnosti extrakce. Čas promývání závisí také na objemu nadávkovaného vzorku a na kapacitě předkolony. Správné nastavení těchto parametrů zabraňuje ztrátám analytů na jedné straně, na straně druhé zaručí kompletní odstranění balastních složek vzorku. Složení mobilní fáze by mělo být rovněž takové, aby se analyty zakoncentrovaly na předkoloně, tedy ještě před přenesením na analytickou kolonu, čímž se redukuje efekt chvostování píků. Jako promývací mobilní fáze se nejčastěji používá voda s malým přídatkem organického rozpouštědla, u silně kyselých či bazických analytů se voda nahradí vhodným pufrem. V posledních letech se používají přísady surfaktantů jako modifikátorů mobilních fází, které zvyšují výtěžnost extrakce, zejména v případech, kdy jsou analyty pevně vázány k proteinům vzorku. V případě použití velmi citlivých detektorů je dobré, aby bylo složení promývací a separační

mobilní fáze co nejvíce podobné, neboť se tak zabrání výchyilkám (kolísání) nulové linie (280).

Selektivita CSW techniky je v porovnání s použitím off-line extrakce a následné analýzy vyšší. Dalšího zvýšení selektivity této techniky může být dosaženo použitím různých předkolon a analytických kolon. Zařízení přepínání kolon disponuje významnou flexibilitou, protože zde mohou být využity různé extrakční a analytické kolony s různými sorbenty. Mezi nejoblíbenější analytické kolony začleňované do CSW patří tradiční RP-C18, dále jsou to C8, fenyl-, cyano- (281). V poslední době se stále častěji používají monolitické analytické kolony (282). Jako extrakční předkolony se nejčastěji používají RAM (zejména LiChrospher RP-18 ADS) či LPS (např. Oasis HLB). Použitím chirálních stacionárních fází v systému přepínání kolon získáme výkonnou techniku pro stereoselektivní analýzu např. léčiv v biologických tekutinách. Příkladem použití takového systému je stanovení enantiomerů ketoprofenu v plazmě (283).

Citlivost techniky CSW je vysoká, zejména díky tomu, že umožňuje prekoncentrační krok, založený na nástřiku velkého objemu vzorku na extrakční předkolonu (284, 285). Citlivost byla dále zvýšena zapojením citlivých detektorů, např. MS detektoru, jako v případě kvantifikace granisetronu a jeho metabolitů v plazmě (286). Vysoké citlivosti je dosaženo také tím, že jsou veškeré zadržené analyty přeneseny z předkolony na analytickou kolonu, resp. do detektoru, ne pouze jejich část, jak tomu bývá u off-line extrakčních technik.

Celkový čas analýzy (TAT, total analysis time) CSW techniky je v porovnání s časem off-line extrakčních technik a časem následné analýzy výrazně kratší. Závisí nejen na povaze stanovovaných látek a matrice, ale také na typu extrakční předkolony i analytické kolony. Použijeme-li jako extrakční sorbent LPS, který umožňuje rychlý průtok mobilní fáze, je extrakční krok velice rychlý a limitujícím krokem analýzy je samotná chromatografická analýza. Proto, chceme-li krátký TAT, musíme použít krátké analytické kolony, plněné malými částicemi, které rovněž pracují při vysoké rychlosti toku mobilní fáze. Za těchto podmínek je TAT často kratší než 5 min. V případě použití RAM extrakčních sorbentů závisí TAT nejen na separačním čase, ale také na čase extrakčním. Pro extrakci vzorku na RAM se totiž používá tradiční rychlost toku mobilní fáze, proto je TAT delší. Přesto je technika CSW s on-line extrakcí využívající RAM velmi rychlou a účinnou metodou analýzy vzorku (287). Výkonnost CSW může být dále zvýšena současným zapojením více extrakčních předkolon do systému. Příkladem

je systém spojující jednu analytickou kolonu se dvěma střídajícími se extrakčními předkolonami. V tomto zařízení se vždy jedna předkolona kondicionuje, zatímco druhá je on-line spojená s analytickou kolonou, na níž dochází k separaci. Protože jsou analýzy prováděny paralelně, nemusí se do TAT započítávat žádný čas, potřebný pro uvedení extrakčního nosiče do rovnováhy. Tento přístup byl použit např. při stanovení granisetronu a jeho metabolitu v plazmě (221) či k analýze guanidinových léčiv v plazmě (288).

Zlepšení parametrů separačního procesu lze dosáhnout správným výběrem délky kolony a předkolony, jejich sorbentů, složením mobilních fází, naprogramováním přepínání ventilu či volbou detektoru v chromatografickém systému.

2.6.4.4. Výhody a nevýhody CSW

Mezi hlavní výhody CSW patří jednoduchost provedení, plná automatizace procesu, on-line zpracování vzorku v chromatografickém systému, minimalizace manuální přípravy vzorku k analýze, čímž dochází ke zvýšení přesnosti, správnosti, selektivity a citlivosti analýzy. Navíc se významně zkracuje čas, potřebný pro zpracování vzorků a tím i čas průběhu celé analýzy. Na rozdíl od tradičních off-line extrakčních technik má CSW výrazně nižší spotřebu organických rozpouštědel. CSW rovněž nevyžaduje použití vnitřního standardu, chrání fotolabilní analyty během analýzy před světlem a díky minimálnímu počtu manuálních kroků je i v případě práce s potenciálně infekčními vzorky bezpečná pro personál. Vzorek se před nástřikem do zařízení pouze naředí, centrifuguje či přefiltruje, což vede k prodloužení životnosti extrakční předkolony. Technika je použitelná pro stanovení široké škály látek v různých komplexních maticích, stačí vybrat a zapojit vhodnou předkolonu, analytickou kolonu a detektor (246).

K nevýhodám CSW patří vyšší požadavky na analytické vybavení (přepínací ventil, extrakční předkolona, přídavná pumpa), pravidelná výměna předkolon, podmínka kompatibility používaných mobilních fází. V některých případech je dosaženo nižší výtěžnosti extrakce, což může být způsobeno příliš pevnou vazbou analytu na proteiny ve vzorku, která se nerozruší ani zředěním vzorku či přidávkem organického rozpouštědla před nástřikem na předkolonu. Množství přídavku organického rozpouštědla je limitováno jeho mírou schopnosti denaturovat proteiny (246).

2.6.4.5. Využití techniky CSW

Technika CSW je v praxi nejčastěji využívána k on-line extrakci analytů (hlavně léčiv a jejich metabolitů) z různých komplexních vzorků (např. biologického materiálu) a následné separaci zadržených analytů, jejich detekci a kvantifikaci v jednom kroku. Umožňuje přímý nástřik neupraveného vzorku do chromatografického systému. V zásadě mohou být nadávkovány všechny kapalné biologické vzorky, pevné vzorky mohou být zpracovány po předchozím rozpuštění a homogenizaci. Typ matrice a množství nadávkovaného vzorku určuje životnost předkolony. Nejproblematictější jsou biologické tekutiny, které obsahují velkou frakci proteinů a buněk, tzn. krev, plazma a sérum. Cerebrospinální a intersticiální tekutiny či moč, které mají nižší obsah proteinů, stačí před analýzou přefiltrovat, výše uvedené materiály s vyšším obsahem proteinů je vhodné z důvodu prodloužení životnosti předkolony centrifugovat, ředit a filtrovat. Proteiny mohou být rovněž precipitovány a odstraněny před nástřikem do chromatografického systému. Technika CSW v tomto případě slouží jako náhrada tradičních off-line extrakčních technik (LLE, SPE) s následnou chromatografickou analýzou a umožňuje vyčištění, zakoncentrování, separaci, detekci a kvantifikaci analytů ze vzorku biologického materiálu v jednom kroku. Toto využití CSW je v současné době nejrozšířenější a je publikováno ve spoustě odborných prací. Podrobný přehledový článek týkající se využití CSW sepsali Sadílek a kol. (246).

Další využití této techniky se týká eliminace nežádoucích produktů po off-line derivatizaci, neboť je možné vhodným načasováním přepnutí ventilu eluovat na separační kolonu pouze zónu okolo stanovovaného produktu a všechny ostatní produkty derivatizace s kratším, nebo naopak delším retenčním časem vymýt do odpadu. Techniku lze využít také k usnadnění on-line derivatizace mnoha látek jejich zachycením na reakční předkoloně, např. při stanovení amfetaminu v plazmě s využitím derivatizační kolony plněné fluorescenčním materiálem (289).

V posledních letech se velmi rozvíjejí CSW techniky sloužící k separaci enantiomerních léčiv v biologických tekutinách, spojením chirálních systémů s tradičními RP kolonami. Počet použitých kolon a jejich pořadí je různé, k získání adekvátní rozlišovací schopnosti. Wallhagen a kol. (290) použili CSW k izolaci enantiomerů terbutalínu, metoprololu, oxazepamu a bipivacainu v plazmě. První kolonu měli naplněnou chirální stacionární fází k rozdělení enantiomerů, které poté zachytili a zakoncentrovali na dvou oddělených achirálních kolonách a následně přenesli na čtvrtou kolonu pro finální separaci. Celkovým efektem bylo zvýšení účinnosti extrakce

a selektivity stanovení. Hsieh a Huang (291) popsali separaci enantiomerů hlavních metabolitů fenytoinu v různých biologických vzorcích. Zde byl nejdříve racemát zachycen na RP předkoloně a následně přenesen na chirální ligand-výměnnou kolonu, kde byly enantiomery odděleny. Podobné schéma bylo použito k rozlišení enantiomerů verapamilu v plazmě (292).

Technika CSW se dá využít také ke zkrácení doby analýzy směsi látek s rozdílnou polaritou, resp. s velkými rozdíly v retenčních časech, např. při analýze katecholaminů a jejich metabolitů. Pro jejich stanovení vyvinuli Julien a kol. (293) systém, složený ze čtyř přepínacích ventilů a čtyř kolon, plněných stejnou stacionární fází, ale s rozdílnou délkou. Po off-line úpravě vzorku jsou analyty s velkou polaritou eluovány přes všechny čtyři kolony, zatímco analyty s malou polaritou jsou eluovány pouze přes tu první. Díky tomu je celkový čas analýzy snížen ze 60 na 35 min. a jednotlivé látky jsou dostatečně odseparovány.

Velice zajímavou formou využití column-switching je tzv. boxcar chromatografie, vyvinutá Snyderem a kol. (294). Boxcar konfigurace zahrnuje částečnou separaci jedné či několika látek zájmu na primární koloně, s odkloněním konkrétní frakce na sekundární kolonu. Tato technika umožňuje efektivní separaci s významnou redukcí celkového času analýzy. Boxcar konfigurace byla vyvinutá např. pro stanovení antiepileptik a jejich metabolitů v séru (295).

VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole je podán stručný komentář k publikovaným pracím. Úplný text publikovaných prací je uveden v kapitole následující. Plakátová sdělení prezentovaná na konferencích nejsou komentována, je zde uveden pouze výčet těch, jejichž jsem hlavní autor.

A. Přehled publikovaných prací

Přehled přijatých publikací:

1. Sadílek P., Šatínský D., Solich P.: **Using restricted-access materials and column-switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices**, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 375-384. IF¹ = 6,602. Citováno²: 32x.
2. Sadílek P., Šatínský D., Ořapka M., Sladkovský R., Solich P.: **Rapid and simple determination of vitamin A and vitamin E in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography**, *Curr. Anal. Chem.* 5 (2009) 311-315. IF¹ = 1,809.
3. Nováková L., Bláha M., Sadílek P., Šatínský D., Solich P., Bláha V., Solichová D., Malý R., Blažek M., Filip S., Malý J.: **Pharmacodynamic of statins – development of the method for their determination in biological material**, *Ateroskleróza* 11 (2007) 100 – 106.
4. Nováková L., Vlčková H., Šatínský D., Sadílek P., Solichová D., Bláha M., Bláha V., Solich P.: **Ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin**, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 2093 – 2103. IF¹ = 2,971. Citováno²: 8x.

¹ Hodnota impact faktoru je z roku 2011.

² Dle databáze Web of Science k 03/2012.

Přehled plakátových sdělení:

1. Sadílek P., Šatínský D., Špačková J., Sladkovský R., Solich P.: **Simultaneous determination of atorvastatin, simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with UV detection**, 26th *International Symposium on Chromatography*, Copenhagen, 21. – 25. 8. 2006.
2. Sadílek P., Šatínský D., Solich P.: **Using of restricted-access materials and column-switching systems in HPLC for on-line sample preparation**, *Joint Meeting 2006*, Marburg, 4. – 7. 10. 2006.
3. Sadílek P., Šatínský D., Solich P.: **Využití materiálů s omezeným přístupem (RAM) v systému přepínání kolon v HPLC pro on-line úpravu vzorků a přímou analýzu biologicky aktivních látek v komplexních matricích**, 35. *konference Syntéza a analýza léčiv*, Velké Karlovice, 12. – 15. 9. 2006.
4. Solich P., Sadílek P., Sladkovský R., Líška M., Nováková L.: **Determination of statins by HPLC with fluorescence detection**, XIIIth *International symposium on luminescence spectrometry*, Bologna, 7. – 11. 9. 2008.

B. Komentáře k publikovaným pracím

Publikované práce jsou rozděleny do dvou tematických celků. První se věnuje zejména problematice přípravy vzorku biologického materiálu před vlastní analýzou s využitím moderních trendů, jako jsou RAM a technika přepínání kolon. Tento způsob přípravy vzorku byl použit při analýze vitamínu A a vitamínu E v plazmě a séru.

Druhý tematický celek se zabývá problematikou chromatografického stanovení statinů a jejich metabolitů v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích po předchozí SPE.

B.1. Využití RAM a CSW v HPLC pro přímou analýzu léčiv v biologickém materiálu

Příprava vzorku k analýze je zpravidla časově i manuálně nejnáročnějším krokem celé analýzy, který výrazně ovlivňuje její celkový čas, ale také přesnost a správnost naměřených výsledků. Zejména při analýze vzorků biologického materiálu je to krok zcela nezbytný, neboť na jeho správném provedení závisí nejen výsledek stanovení, ale také životnost analytické instrumentace, zejména separační kolony.

Vzorky biologického materiálu se doposud nejčastěji zpracovávají tradičními off-line extrakčními technikami, zejména LLE a SPE, které zajistí extrakci a zakoncentrování stanovovaných analytů do malého množství organického rozpouštědla a odstranění balastních látek ze vzorku. V případě vyšetřování velkých sérií vzorků je však jejich příprava těmito technikami časově náročná, pracná, obtížně automatizovatelná, s vysokou spotřebou organických rozpouštědel a tvorbou velkého množství toxického odpadu. Z těchto důvodů byla snaha vyvinout taková extrakční zařízení, která by tyto nevýhody co nejvíce eliminovala a která by umožňovala rychlou a plně automatizovatelnou extrakci.

Všechny uvedené podmínky splňují moderní extrakční předkolony plněné speciálními extrakčními sorbenty, tzv. materiály s omezeným přístupem (RAM), které je možné zapojit přímo do chromatografického systému technikou přepínání kolon (CSW) a které umožňují opakovanou on-line extrakci malých molekul analytů, např. léčiv, z komplexních maticí, např. vzorku biologického materiálu, přímo v HPLC. Tyto extrakční sorbenty nejenže umožňují přímý nástřik vzorku bez jeho předchozí úpravy do chromatografického systému, dovolují nástřik opakovaný, plnou automatizaci extrakce, rychlé zpracování velkého počtu vzorků a ve srovnání s tradičními off-line extrakčními technikami mají výrazně nižší spotřebu organických rozpouštědel.

Jak již bylo zmíněno, extrakční předkolony plněné RAM jsou do chromatografického systému zapojeny technikou přepínání kolon přes vícecestný přepínací ventil. Neupravený vzorek je dávkován do proudu promývací mobilní fáze, kterou je nanesen na extrakční předkolonu. Na koloně dojde k zadržení cílových nízkomolekulárních analytů sorbentem, zatímco jsou balastní látky vymyty do odpadu. Následuje přepnutí ventilu a zadržené analyty jsou přeneseny analytickou mobilní fází na separační kolonu, kde dojde k jejich separaci. Celý proces končí jejich detekcí nejčastěji v UV či MS detektoru.

System je konstruován tak, že během separace analytů dojde k dokonalému vymytí předkolony, během extrakce na předkoloně zase dochází k promývání a kondicionaci analytické separační kolony a díky rychlé kondicionaci předkolony je systém schopen zpracovávat další vzorek téměř okamžitě po skončení předchozí analýzy. Tím dochází k výraznému zrychlení analýzy velkých sérií vzorků.

B.1.1. Komentář k práci č. 1: „Using restricted-access materials and column-switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices“.

Tato publikovaná práce je rešeršního charakteru. Jejím cílem bylo podat podrobné informace o tom, co jsou to materiály s omezeným přístupem a k čemu se používají, jaké existují typy těchto sorbentů, jaké materiály jsou komerčně dostupné, dále se zabývá způsoby zapojení těchto materiálů do průtokových analytických systémů (HPLC, SIA), módy zapojení technikou přepínání kolon, srovnáním CSW-RAM s tradičními off-line extrakčními technikami LLE a SPE a výhodami a nevýhodami RAM. Nakonec byly v této práci souhrnně uvedeny dosud publikované aplikace techniky CSW-RAM-HPLC v různých oblastech analytické praxe. Práce zahrnuje 43 citací z období let 1985 – 2005.

Článek popisuje strukturu a principy extrakce na všech 5 typech RAM, které se liší zejména typem bariéry, typem stacionární fáze s funkčními skupinami, typy vazebných interakcí mezi stacionární fází a extrahovanými analyty, stabilitou vůči složení, pH a rychlosti průtoku mobilní fáze, maximálním povoleným tlakem na předkoloně a životností.

Studiem aplikací RAM v odborné literatuře se ukázalo, že nejčastěji používaným komerčně dostupným sorbentem je LiChrospher RP-18 ADS (Merck), patřící do skupiny ISRP. Základem tohoto materiálu je silikagel s velikostí částic 25 μm , v jehož pórech jsou navázány hydrofóbní funkční skupiny C4, C8 či C18 a na povrchu diolové hydrofilní skupiny.

Technika on-line extrakce pomocí CSW-RAM je v článku přehledně porovnána s tradičními extrakčními technikami LLE a SPE. Její výhody a nevýhody jsou rovněž uvedeny pro přehlednost v tabulce. Ze studia odborné literatury je však jasně patrný veliký nárůst aplikací těchto moderních extrakčních sorbentů v posledních letech, což jasně vypovídá o jejich výhodách a o směrech vývoje přípravy vzorku k analýze.

Využití CSW-RAM-HPLC v praxi je v článku přehledně zpracováno ve formě tabulky, ve které je vždy uvedena oblast využití této techniky; matrice, ze které byly stanovované analyty extrahovány; extrahované analyty; typ použitého RAM a odkaz na literaturu. Většina publikovaných prací se zabývala stanovením léčiv a dalších biologicky aktivních látek v tělních tekutinách. Druhou největší oblastí využití RAM byl monitoring životního prostředí a třetí velkou skupinou byla analýza potravin. Další způsoby využití RAM se vyskytovaly pouze sporadicky.

Díky svým nesporným výhodám budou pravděpodobně RAM nacházet v klinické praxi čím dál větší uplatnění a postupně budou nahrazovat spolu s ostatními mikroextrakčními technikami tradiční extrakční metody, zejména při zpracování velkých sérií vzorků v rutinních provozech.

B.1.2. Komentář k práci č. 2: „Rapid and simple determination of vitamin A and vitamin E in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography“.

Cílem této práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat rychlou, reprodukovatelnou a plně automatizovanou HPLC metodu s on-line extrakcí pomocí RAM a CSW pro současné stanovení vitamínu A a vitamínu E v biologickém materiálu (v plazmě a v séru).

Vitamíny A a E patří do skupiny vitamínů rozpustných v tucích. Mají výrazné antioxidační účinky, proto je v současné době velmi intenzivně zkoumán jejich účinek, zejména ve vztahu k nádorovým onemocněním, ale také k průběhu zánětlivých procesů či dalších civilizačních chorob, např. kardiovaskulárních. Z tohoto důvodu se studiem těchto látek zabývá v současné době mnoho vědeckých i klinických pracovišť, které potřebují k výzkumu zavedené moderní analytické metody pro stanovení těchto analytů v komplexních maticích, zejména v biologickém materiálu. Protože je na stanovení těchto vitamínů v tělních tekutinách nejsložitější, nejpracnější a časově nejnáročnější příprava vzorku před analýzou, která se obvykle provádí některou z tradičních off-line extrakčních technik LLE či SPE, rozhodli jsme se zavést HPLC metodu s on-line extrakcí přímo v chromatografickém systému pomocí RAM a CSW, která by problémy s přípravou vzorku k analýze elegantně vyřešila.

Použitý chromatografický systém byl pro zapojení extrakční předkolony technikou CSW upraven v laboratoři. V době měření ještě nedisponovalo naše pracoviště vysokotlakým vícecestným přepínacím ventilem zabudovaným do HPLC,

proto byl použit nízkotlaký šesticestný přepínací ventil ze SIA, který byl spolu s přídatnou pumpou připojen ke standardnímu HPLC zařízení firmy Waters s UV detektorem Waters 486. Z důvodu použití nízkotlakého přepínacího ventilu nebylo možné použití částicových separačních kolon pro jejich vysoký zpětný tlak, proto musela být k separaci analytů použita kolona monolitická. Jako extrakční předkolona plněná RAM byla použita, dle literatury nejpoužívanější, LiChroCART (25 x 4 mm) plněná LiChrospher RP-18 ADS, zapojená do chromatografického systému v módu back-flush, aby nedocházelo k rozmývání zón separovaných analytů.

Během optimalizace celé analýzy, která zahrnovala on-line extrakci na RAM předkoloně, vymytí balastních látek z matrice vzorku biologického materiálu, zakoncentrování stanovovaných analytů, jejich přenesení na analytickou kolonu, separaci a detekci v UV detektoru, se testovalo různé nařazení vzorku směsí různých organických rozpouštědel, složení a rychlost průtoku promývací mobilní fáze včetně přísady vhodné koncentrace surfaktantu, složení a rychlost průtoku analytické separační mobilní fáze, ale také naprogramování vhodného času přepnutí ventilu v takovém čase, aby už byly veškeré balastní látky vymyty z předkolony do odpadu, ale aby ještě nedocházelo ke ztrátám zadržených analytů jejich elucí. Veškeré parametry byly upravovány tak, aby došlo k dokonalé separaci stanovovaných analytů a vnitřního standardu (acetát vitamínu E) s dosažením rozumného celkového času analýzy a zejména k dosažení maximální výtěžnosti extrakce.

Během výběru promývací mobilní fáze jsme se setkali s problémem zadržování stanovovaných analytů v systému, někde v prostoru mezi autosamplerem a extrakční předkolonou. Problém byl řešen nejprve zvyšováním eluční síly promývací mobilní fáze navyšováním obsahu organické složky, což sice rozpustnost vitamínů v promývací mobilní fázi zvyšovalo, hrozilo však denaturací proteinů biomatrice. Problém byl nakonec vyřešen přidávkou surfaktantu do promývací mobilní fáze.

K dosažení co nejvyšší výtěžnosti extrakce a maximálního odstranění rušivé matrice vzorku byla nutná drobná příprava vzorku před analýzou. Vyšší výtěžnosti vitamínů z biologického materiálu bylo dosaženo přidávkou směsi organických rozpouštědel ke vzorku před extrakcí.

Optimalizací analytického procesu jsme dospěli k následujícím chromatografickým podmínkám: promývací mobilní fáze methanol-vodný roztok 20 mM SDS 30:70 (v/v), rychlost průtoku 1,3 ml/min.; analytická mobilní fáze – gradientová eluce methanol-voda 90:10 (v/v) → 100 % methanol, průtok 1,0 ml/min.;

přepnutí ventilu 4 minuty po nástřiku vzorku do systému. Vzorek biologického materiálu byl před nástřikem naředěn směsí isobutanolu-isopropanolu 3:2 v poměru 1:1, centrifugován, supernatant nadávkován do systému. Objem nástřiku 50 μ l.

Vyvinutá metoda byla validována s ohledem na linearitu, přesnost, správnost, selektivitu a citlivost, limit detekce a limit kvantifikace. Veškeré numerické výsledky validace metody jsou přehledně uvedeny v článku v tabulce.

Závěrem lze říci, že se podařilo vyvinout a validovat rychlou, jednoduchou, levnou, citlivou, plně automatizovanou metodu pro současné stanovení vitamínu A a vitamínu E v biologickém materiálu s on-line extrakcí probíhající na RAM sorbentech přímo v chromatografickém systému. Celkový čas analýzy byl 15 minut, což je výrazné urychlení oproti klasické extrakční technice LLE či SPE, následované chromatografickou analýzou. Přídavkem surfaktantu do promývací mobilní fáze a směsi isobutanolu-isopropanolu ke vzorku biologického materiálu jsme dosáhli vynikající výtěžnosti vitamínu A, mírně horší pro vitamín E, což může být způsobeno jeho vyšší lipofilitou či jeho větší vazbou na plazmatické proteiny. Metoda byla vyzkoušena na stanovení vitamínu A a vitamínu E v reálných vzorcích plazmy pacientů FN Hradec Králové. Nalezené hladiny vitamínů se nacházely ve fyziologických mezích.

B.2. Analýza statinů a jejich metabolitů v biologickém materiálu

Statiny jsou v současnosti nejvíce používanou skupinou léčiv při léčbě hypercholesterolémie. Výrazně snižují hladinu celkového cholesterolu, LDL frakce lipoproteinů a triglyceridů v plazmě. Tím významně snižují morbiditu i mortalitu kardiovaskulárních onemocnění. Mechanismus účinku spočívá v inhibici mikrozomální 3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A reduktázy, což je klíčový enzym katalyzující přeměnu hydroxymethylglutaryl-koenzymu A na mevalonát. Tím dojde k zablokování syntézy cholesterolu. U těžkých forem hypercholesterolémie je nutné podávat statiny v maximálních tolerovatelných dávkách, s čímž souvisí zvýšený výskyt jejich nežádoucích účinků, jako je např. bolest a svalová slabost, akutní poškození ledvin či vzácně intersticiální plicní onemocnění.

Léčba statiny není dosud laboratorně monitorována, především z důvodu, že neexistuje žádná k tomuto účelu vhodná analytická metoda, která by splňovala všechny kladené požadavky. Dávka se nastavuje pro každého jedince individuálně v závislosti

na úpravě hladin celkového cholesterolu a jednotlivých lipoproteinových frakcí s přihlédnutím k možnému výskytu nežádoucích účinků. Možnost monitorovat hladiny statinů v biologickém materiálu by bylo z klinického hlediska velice přínosné a mohlo by vést k zefektivnění a zlevnění léčby při zachování hypolipidemického účinku a snížení výskytu nežádoucích účinků. Největší přínos by mělo monitorování hladin statinů u těžkých hypercholesterolémií, např. u familiární hypercholesterolémie, u které musí pacienti kromě užívání vysokých dávek statinů, často v kombinaci s dalšími léky, docházet pravidelně na extrakorporální eliminaci cholesterolu a lipoproteinů aferézou a vyvstává zde otázka, zda v tomto případě nedochází také k odstraňování podávaného léčiva z organismu. Hodně přínosné by bylo také monitorování hladin statinů u hemodialyzovaných pacientů, neboť je známo, že renální dysfunkce výrazně ovlivňuje metabolismus léčiv v játrech, což by mohlo vést k hromadění statinů či jejich aktivních metabolitů v organismu a tím zvyšovat riziko klinicky významných nežádoucích účinků. Lze předpokládat, že kromě změn jaterního metabolismu lipoproteinů bude klinicky významná také odlišná distribuce statinů v již abnormálně modifikovaných lipoproteinových frakcích.

Cílem společného projektu Katedry analytické chemie a klinických pracovišť FN Hradec Králové bylo vyvinout a validovat rychlou, jednoduchou, levnou, citlivou, selektivní metodu pro stanovení statinů a jejich biologicky aktivních metabolitů v tělních tekutinách a v lipoproteinových frakcích, naměřit výsledky na souboru pacientů s těžkou familiární hypercholesterolémií, získané výsledky klinicky interpretovat a využít k optimalizaci a zefektivnění léčby těchto pacientů s minimem vedlejších účinků.

B.2.1. Komentář k práci č. 3: „Pharmacodynamic of statins – development of the method for their determination in biological material”.

Tato práce popisuje počátky vývoje metod pro stanovení statinů v biologickém materiálu na Katedře analytické chemie Faf v Hradci Králové. Tím, že článek vznikl v úzké spolupráci s klinickými pracovišti FN Hradec Králové, popisuje také klinické využití vyvinuté techniky a možnosti aplikace naměřených výsledků v praxi.

V úvodu tohoto článku popisují klinici důležitost vývoje metody stanovení nejčastěji používaných statinů v tělních tekutinách, která by vedla k optimalizaci, zefektivnění, zlevnění a k větší bezpečnosti relativně drahé terapie. Vývoj této metody byl zvláště důležitý pro specifickou skupinu pacientů s těžkou familiární

hypercholesterolémií, kteří jsou dlouhodobě léčeni maximálními tolerovatelnými dávkami statinů, většinou v kombinaci s dalšími léky, s dietními změnami a změnami životního stylu, doplněné pravidelnou extrakorporální eliminací cholesterolu a lipoproteinů aferézou. Právě pro tuto skupinu pacientů vznikla hypotéza, zda nedochází spolu s odstraňováním cholesterolu a lipoproteinových frakcí také značného množství podávaných léčiv. Výrobci sorbentů a filtrů používaných k aferéze sice tvrdí, že jejich produkty vychytávají z oběhu pacienta selektivně pouze cholesterol a LDL lipoproteiny a že by neměly výrazně ovlivňovat další plazmatické složky, výzkum kliniků FN a zkušenosti s více než 1500 aferézami ukázaly, že během LDL aferézy dochází k poklesu celkové bílkoviny až o 25 %. Tudíž musí pravděpodobně docházet také k odstraňování léčiv vázaných na plazmatické proteiny, což je případ právě statinů.

Článek dále charakterizuje z klinického hlediska skupinu vyšetřovaných pacientů, popisuje jejich farmakoterapii a používané terapeutické procedury – LDL aferézu a hemorheoferézu.

Dále se už publikace zabývá vývojem vhodné analytické metody, umožňující rychlou, citlivou, selektivní, levnou analýzu dvou nejčastěji podávaných statinů (simvastatinu a atorvastatinu) v biologickém materiálu, na našem pracovišti.

Jako první jsme vyvinuli metodu HPLC s UV detekcí. Tato metoda byla sice rychlá a jednoduchá, dosažená citlivost však byla o několik řádů nižší, než jaké jsou terapeutické plazmatické hladiny statinů. Vývoj této metody byl testován přesto, že většina v té době dostupné odborné literatury používala ke stanovení statinů v biologickém materiálu GC a HPLC-MS. Naší snahou však bylo vyvinout metodu na co nejdostupnější analytické instrumentaci, která by byla dostupná v co největším počtu klinických laboratoří.

Následně jsme se na našem pracovišti pokoušeli vyvinout HPLC metodu s fluorescenční detekcí. Statiny však primárně nefluoreskují, proto je nutná předchozí derivatizační reakce s vhodným derivatizačním činidlem. Dosažená citlivost zde byla výrazně vyšší než u UV detekce, přesto minimálně o řád nižší, než bylo potřeba. Navíc se vyskytly velké komplikace během derivatizačního kroku. Ani jedno ze tří testovaných derivatizačních činidel (4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin, 1-bromoacetylpyren and 9-anthryldiazomethan) nedávalo reprodukovatelné výsledky, derivatizační krok byl velice časově náročný a pracný, byla velká spotřeba derivatizačního činidla, simvastatin jako lakton nereagoval vůbec, u atorvastatinu vznikalo obrovské množství reakčních produktů. Proto bylo naší snahou zapojit do

chromatografického systému pomocí CSW předkolonu plněnou RAM a cíleně tak odstranit zbytky derivatizačního činidla a reakční produkty s nižší i vyšší retencí na koloně, než má stanovovaný produkt, do odpadu a na analytickou kolonu přenést pouze frakci obsahující stanovovaný analyt. Vše však ztroskotalo na špatně reprodukovatelném průběhu derivatizační reakce.

Poté byla testována metoda GC, která se však také potýkala s problémy derivatizace. Ukázalo se, že statiny mají více reakčních míst v molekule, tudíž vznikalo větší množství reakčních produktů, což komplikovalo kvantifikaci. Dále zde byl velice dlouhý čas derivatizace i analýzy. Navíc při použití dostupného plamenoionizačního detektoru byla citlivost techniky cca o dva řády nižší, než bylo potřeba ke stanovení terapeutických hladin statinů v biologických materiálech.

Nakonec byla vyvinuta metoda využívající UPLC-MS/MS, která jako jediná dávala dostatečnou citlivost a reprodukovatelnost s vysokou selektivitou a bez nutnosti derivatizace, umožňovala současné stanovení simvastatinu a atorvastatinu a byla rychlá, přesná a relativně levná. Jedná se vlastně o první dostupnou metodu současného stanovení simvastatinu a atorvastatinu v biologickém materiálu s citlivostí odpovídající terapeutickým plazmatickým koncentracím. Metoda bude použita v dalším výzkumu farmakokinetiky statinů, zejména ve vztahu k LDL aferéze a optimalizaci léčby.

B.2.2. Komentář k práci č. 4: „Ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin“.

Tato druhá práce, zabývající se problematikou stanovení statinů v biologickém materiálu, navazuje na práci přechozí, ze které vyplynulo, že jedinou možnou technikou stanovení terapeutických hladin statinů na našem pracovišti je metoda UPLC-MS/MS, která je nejen dostatečně citlivá a selektivní, ale především dává reprodukovatelné výsledky. Podrobným studiem metabolismu léčiv jsme rovněž došli k závěru, že nestačí monitorovat pouze samotné statiny, ale že bude potřeba stanovovat také jejich biologicky aktivní metabolity.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat rychlou, spolehlivou, citlivou a selektivní metodu pro současné stanovení nejčastěji podávaných statinů (simvastatinu a atorvastatinu) a jejich biologicky aktivních metabolitů pomocí UPLC-MS/MS.

Statiny jsou typickými léčivy, u kterých dochází k interkonverzi mezi formou laktonu a hydroxykyseliny po otevření kruhu. Při analýze takových látek je nutné

udržovat hodnotu pH v určitém intervalu, zde pH 4 – 5, aby k interkonverzi nedocházelo.

Metoda byla vyvinuta pro stanovení proléčiva simvastatinu (lakton) a jeho aktivního metabolitu β -hydroxykyseliny, která vzniká jeho hydrolyzou v játrech. Současně umožňuje stanovit také atorvastatin ve formě hydroxykyseliny (aktivní forma) i laktonu a jeho dvou aktivních metabolitu vznikajících v játrech – orto-hydroxyatorvastatinu a para-hydroxyatorvastatinu.

Příprava vzorků biologického materiálu (sérum a lipoproteinové frakce) k analýze byla provedena pomocí SPE. Během optimalizace extrakčního kroku byly testovány sorbenty Zorbax SPE-C18, Oasis HLB a Discovery DSC-18. Během optimalizace a validace metody se jevil jako nejvhodnější, zejména dle dosažené výtěžnosti stanovovaných analytů, Discovery DSC-18. Optimalizací extrakčních podmínek jsme dospěli k následujícím parametrům: kondicionace SPE sorbentu nejprve acetonitrilem, poté acetát amoniovým pufrům o pH 4,5; nanesení vzorku naředěného stejným pufrům v poměru 1:1; promytí SPE kolony 1 ml směsí ACN:0,01 M acetát amoniového pufru o pH 4,5 (15:85 v/v); eluce zadržených analytů 1 ml směsí ACN:0,01 M acetát amoniového pufru o pH 4,5 (95:5 v/v).

Chromatografická analýza byla provedena na UPLC System Acquity (Waters). Optimalizací metody byla vybrána jako nejvhodnější analytická kolona BEH C18 (100 x 2,1 mm, velikost částic 1,7 μ m). Optimalizací složení mobilní fáze, typu použitého pufru, jeho koncentrace a pH, rychlosti průtoku mobilní fáze atd. se jevila jako nejlepší směs ACN a 0,5 mM acetát amoniového pufru o pH 4. Nakonec byla použita gradientová eluce, kdy na počátku byl poměr ACN: pufru 30:70 (v/v) a postupně se přecházelo až na ACN: pufr 95:5 (v/v). Optimální rychlost průtoku byla 0,25 ml/min. a kolona byla termostatována na 35 °C. Objem nástřiku byl 5 μ l. Detekce byla provedena pomocí MS/MS trojitým kvadrupolovým systémem Quattro Micro (Micromass), ionizace ESI.

Vyvinutá metoda byla validována. Byl proveden test vhodnosti chromatografického systému, kalibrační křivky pro všechny sledované analyty lineární v rozsahu 0,1 – 100 nmol/l, přesnost, správnost, selektivita, LOD a LOQ. Podrobný popis validace a její numerické výsledky jsou přehledně uvedeny v článku.

Vyvinutá metoda byla použita ke stanovení statinů v biologickém materiálu dlouhodobě hemodialyzovaných pacientů FN Hradec Králové v konečném stádiu renální insuficience. U každého pacienta byl vyšetřován materiál odebraný před

začátkem dialýzy a materiál odebraný těsně po skončení dialýzy. Vždy se vyšetřoval vzorek séra a jednotlivé lipoproteinové frakce (VLDL, LDL, IDL, HDL) připravené ultracentrifugací v hustotním gradientu NaCl.

Závěrem lze říci, že se podařilo vyvinout rychlou, citlivou, selektivní metodu pro současné stanovení simvastatinu, atorvastatinu, jejich aktivních metabolitů a produktů interkonverze. Metoda byla validována a bylo dosaženo vynikajících výsledků pro linearitu, přesnost, správnost i selektivitu. Výhodou metody je možnost současného stanovení dvou nejčastěji předepisovaných statinů i jejich metabolitů v jedné analýze a s jednou stejnou přípravou vzorku.

Z prvních naměřených výsledků u dialyzovaných pacientů je patrné, že během dialýzy dochází k výraznému poklesu hladin sledovaných léčiv i jejich aktivních metabolitů v séru i v lipoproteinových frakcích. Jsou také patrné výrazné interindividuální rozdíly farmakokinetických parametrů, kdy se po podání stejné dávky léčiva ve stejný čas dvěma pacientům naměří po několika hodinách metabolismu léčiva zcela odlišné koncentrace v séru i v jednotlivých lipoproteinových frakcích.

PŘÍLOHY

Příloha I

Petr Sadílek, Dalibor Šatínský a Petr Solich:

Using restricted-access materials and column-switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices, Trends in Analytical Chemistry 26 (2007) 375-384

Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices

Petr Sadílek, Dalibor Šatínský, Petr Solich

In the bioanalytical field, sample preparation is often considered the time-limiting step. Indeed, extraction techniques (e.g., liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE)) are commonly used off-line for biological matrices.

To perform high-throughput analysis, there have been efforts to develop a faster sample-purification process. Special extraction sorbents, such as restricted-access materials (RAMs), allow direct, repetitive injection of complex biological matrices onto these supports. Coupling RAMs to column-switching high-performance liquid chromatography (HPLC) systems is a very attractive approach to biological sample preparation. This technique leads to automation, simplification and speeding up of the sample-preparation process.

In this article, we review coupling of RAMs to column-switching systems and give particular attention to commercially available supports. These RAMs are used in single-column or column-switching configurations for direct analysis of compounds in various biological fluids.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Biological matrix; Column switching; High-performance liquid chromatography; HPLC; RAM; Restricted-access material; Solid-phase extraction; SPE

Petr Sadílek, Dalibor Šatínský*,
Petr Solich
Department of Analytical
Chemistry, Faculty of
Pharmacy, Charles University,
Heyrovského 1203, Hradec
Králové 500 05, Czech
Republic

*Corresponding author.
Tel.: +420 495 067 228;
Fax: +420 495 518 718;
E-mail: satinsky@fd.cuni.cz

1. Introduction

Restricted-access materials (RAMs) have been appearing in the scientific literature in the past two decades. RAMs are used mainly for the analysis of substances with low molecular mass (e.g., drugs, endogenous substances, and xenobiotics) in complex matrices containing high-molecular substances (most frequently proteins). RAMs enable direct injection of

the biological sample into flow-analysis systems without previous sample treatment. They have several different structures, but their mechanism of separation is identical: a hydrophilic barrier enables the small molecules to permeate through the hydrophobic part of the stationary phase, and, at the same time, it excludes the macromolecules (by physical or chemical means, or a combination). Two principles are therefore applied:

- gel chromatography is used to exclude macromolecules (i.e. separation is based on molecular size); and,
- separation of the smaller molecules by adsorption or ion-exchange chromatography (i.e. separation is based on the way that small molecules interact with the stationary phase (see Fig. 1)).

The barrier preventing the entry of macromolecular substances into the hydrophobic part of the stationary phase can be of various types. The pores of the external stationary phase (their size is mostly 60 Å) have been recognized as the physical barrier for macromolecular substances excluding most of the serum and plasmatic proteins. Hydrophilic functional groups on the surface of a sorbent or polymer network, which are bound to the surface of stationary phase by covalent

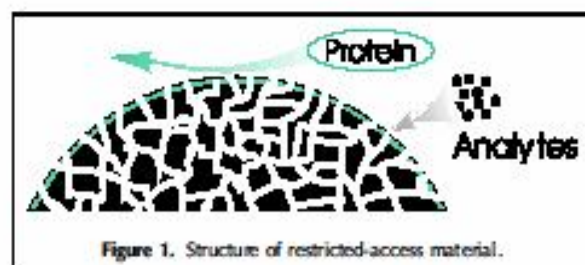


Figure 1. Structure of restricted-access material.

bonding, might also provide a chemical barrier for macromolecules. The polymer network also prevents the proteins from precipitating.

In 1985, Hagestam and Pinkerton [1] published the first paper on the subject of RAMs. Since then, not only has the number of papers on the subject grown but also more types of RAM based on different principles have been developed. There are five basic types of RAM, divided by group according to the nature of the barrier and the surface structure of the sorbent:

- mixed-functional phases and dual-zone materials;
- internal surface reversed-phase packings;
- shielded hydrophobic phases;
- semi-permeable surfaces; and,
- polymeric materials.

2. Types of RAM

2.1. Mixed-functional phases and dual-zone materials

Both the outer and internal surfaces of these materials show identical properties, which are provided by covalent bonding of two different functional groups or by one functional group with two possible interactions.

Silica gel, which has small pores (up to 55 Å), uses randomly distributed hydrophilic groups [2] to ensure the removal of macromolecules from the surface.

Another type of dual-zone stationary phase utilizes two different active centers belonging to one functional group – the hydrophilic part on the surface and hydrophobic chain inside the functional group [3]. Diol stationary phase can be considered as an example of such sorbents. The ethandiol endings of functional groups, which form a hydrophilic layer, preclude access of proteins to the internal stationary phase, whereas methoxypropyl chains covered by a diol surface retain low-molecular mass analytes.

In 1994, Kanda et al. [4] introduced this type of material, which was commercialized under the trade name Capcell Pak MF. Both outer and internal surfaces comprise a mixture of hydrophilic polyoxyethylene and hydrophobic styrene groups bound to a silicone polymer coated with porous silica gel (8 nm). The access of macromolecules is restricted by the long polyoxyethylene chains. Apart from styrene groups, C8, phenyl, and strong cation exchange (SCX) are also available as

hydrophobic groups. Small analytes are retained by the interaction with hydrophobic or ion-exchange groups. These materials have a shorter lifetime than other RAMs, being able to cope with a total volume of only a few ml of biological fluids; however, Capcell Pak MF and Capcell Pak SCX materials have been recognized as a suitable approach for the direct determination of drugs in biological fluids.

2.2. Internal surface reversed phases

Internal surface reversed phases (ISRPs) are the oldest RAMs, introduced by Hagestam and Pinkerton [1] in 1985. These materials are characterized by two types of surfaces, two types of bound functional groups. The hydrophilic phase covers the outer surface of a sorbent, whereas the hydrophobic or ion-exchange phase [5] links to the internal surface of sorbent pores. The internal pore diameter functions as a physical barrier separating macromolecules from low-molecular-mass analytes. The separation mechanism is therefore a combination of reversed-phase and gel chromatography. Small molecules are able to diffuse into pores (60 Å) and are separated according to the hydrophobic interactions with the internal surface. However, the size of the pores does not allow the macromolecular substances to enter, so it excludes them from interaction with hydrophobic chains that are covalent-bound at the internal surface. Glass-fiber filter (GFF) sorbents and alkyl-diol-silica (ADS) are embedded in ISRP materials. GFF sorbents comprise porous silica gel. Their outer surface is covered by hydrophilic diol-glycine groups and the internal hydrophobic surface is formed by tripeptide glycine-phenylalanine-phenylalanine [6].

The retention mechanism is mainly caused by π -electron interactions. Moreover, the free carboxyl-group end of phenylalanine shows weak ion-exchange functionality. The ISRP materials may withstand several thousand plasma (or serum) injections, the total volume equivalent to 6–7 ml. GFF materials are suitable for the direct determination of drugs and drug metabolites in biological matrices, and for direct analysis of endogenous substances in serum and peptides from complex extracts. ADS together with GFF sorbent belongs to the group of the most popular RAMs; both have been produced since the 1990s. The structure of ADS material is very similar to GFF particles. The hydrophilic groups – glyceryl-propyl or diol are bound to the outer surface of particles. The ADS materials [7] are characterized by the different types of reversed phases (butyryl-C4, capryloyl-C8, or stearyl-C18) on the internal surface. New ADS materials are formed by the sulphonic acid groups bound to the internal surface of particles. Ion exchangers, so-called XDS (exchange diol silica), are recognized as a suitable approach for the direct analysis of endogenous substances and pharmaceuticals in biological fluids (plasma, serum, urine, microdialysate, saliva, liver

homogenate, intestinal aspirate, cell cultures, bronchial secrets, maternal milk, and tissues). An ADS pre-column might withstand injection of 80–100 ml of plasma. LiChroCART (25 × 4 mm) filled with LiChrospher ADS RP-18, RP-8 and RP-4, particle size 25 μm (Merck, Darmstadt, Germany), is the most frequently used pre-column.

The preparation of these materials (e.g., alkyl-diol ISRPs) is based on the enzymatic degradation of hydrophobic functional groups (bound at the outer surface of silica gel), while the internal surface is protected against the enzyme thanks to the small pore size. The hydrophilic phase formed by glyceryl-propyl (diol) groups is bonded at the silica gel (pore size of 60 Å).

2.3. Shielded hydrophobic phases

In 1988, Glisch et al. [8] introduced a new type of RAM, named shielded hydrophobic phase (SHP), which is a stationary phase with a chemical barrier preventing the proteins from gaining access to the functional groups that are responsible for separating low-molecular-mass analytes. It is a hydrophilic polyethylene-glycol (or polyethylene-oxide) that forms the embedded hydrophobic phenyl group network within the polymer network and the whole unit is covalently bound onto the silica-gel carrier. The hydrophilic polyethylene-glycol network contains shielding hydrophobic phenyl groups that prevent protein penetration (hydrophilic shielding). Small molecules can still permeate through the polymer layer and interact with hydrophobic groups. The material is produced out of 5-μm silica gel with a pore size of 100 Å. This type of material is commercially available as Hisep SHP (Supelco, USA). The expected lifetime of the sorbents is one of the lowest for all these RAMs – only about 16 ml of serum can be passed through. They are used mainly for pre-concentrating and separating compounds containing phenyl groups [9,10].

2.4. Semi-permeable surfaces (SPSs)

This type of RAM has a typical hydrophilic polymer chemical barrier excluding the proteins from access to the surface. It has both external and internal moieties independently synthesized and, in most cases, covalently bound onto the surface of the silica particles. The outer surface (hydrophilic polyoxyethylene polymer) repels large molecules (such as proteins), while the internal surface, comprising a different type of hydrophobic reversed-phase (e.g., nitrile, phenyl, C8 and C18), retains small analytes that penetrate through the polymer layer.

Initial work in this field used the non-covalent coating of hydrophobic chains achieved with surface-active polymers, tenzides (e.g., Tween and Brij). However, there was a problem with the gradual elution of the polymer layer and regeneration of stationary phase was frequently required. Later, it was replaced by the polyethylene-glycol chain covalently bound directly onto

the surface of the stationary phase (C4, C8, C18, CN and phenyl) [11]. This material is commercially available as SPS (Regis Technologies, USA).

Desllets et al. [12] discovered that the polymer (most frequently of a polyoxyethylene nature) bonded to the surface of a reversed-phase (e.g., C8 or C18) forms a semi-permeable hydrophilic layer that can restrict access of proteins to the underlying hydrophobic stationary phase.

Commercially-available SPS materials differ mainly in the functional groups forming the reversed-phase of the internal surface (e.g., nitrile, phenyl, C8 and C18 are the most common). The lifetime of SPS materials is quite similar to ADS materials and they can cope with being loaded with an amount equivalent to 50 ml of plasma. SPS material has successfully been applied to the analysis of small molecules in biological fluids.

One of the newest types of RAM comprises porous silica gel, the outer surface of which is coated with a human-plasma protein, α1-acid glycoprotein (AGP), which is covalently bound to the C18 stationary phase. AGP is a hydrophilic human protein, which is stable in both its natural and immobilized form. Its stability in the presence of organic solvents in the mobile phase is also quite good. The separation principle is similar to the previously described SPS type, and it enables the quantitative removal of proteins from the sample. It functions on the same principle as a chemical-diffusion barrier, apart from the fact that, in this case, the protein network forms the outer hydrophilic surface instead of the polymer. This extraction sorbent was introduced by Hermansson and Grahn in 1994 [13] and commercialized as BioTrap. It makes the external surface of the particles compatible with a proteinaceous sample that cannot penetrate into small pores (10 nm). Hydrophobic groups (C8 or C18) at the internal surface are responsible for interaction with small analytes. BioTrap can tolerate more than 30 ml of biological fluids, so its lifetime and performance are similar to the materials mentioned above. An advantage of this new material is the wider pH working range (2–10 for BioTrap MS). By comparison, common silica-gel materials have pH within the working range 2.5–7.5. This new RAM has been used for the analysis of (e.g., ibuprofen, naproxen, propranolol, carbamazepin, and phenytoin) in human plasma. BioTrap is produced in two variations, both having the same outer surface but with different internal surfaces:

- BioTrap Amine C18 is produced for the extraction of the basic drugs; and,
- BioTrap Acid C18 is for the analysis of the acid drugs.

2.5. Polymeric materials

Columns packed with polymeric materials are used for pre-concentrating hydrophobic and hydrophilic analytes and for removing high-molecular-mass substances (e.g., proteins) in column-switching systems. These extraction

columns are packed with various types of polymers and their producer (Shimadzu) divides them into the following four basic types: MSpak PK series; MSpak GF-4A; MSpak GF-310 or 320 series; and, Asahipak ODP-51 4B.

MSpak PK columns are packed with hydrophilic copolymers that contain N-vinyl acetamide. They show not only high performance in removal of high-molecular weight substances, such as proteins, but also high adsorption of both hydrophilic and hydrophobic analytes. The recovery rates of drugs from these columns were found to be in the range 90–110%. They are suitable for pre-concentrating trace amounts of different substances and also for on-line sample pre-treatment during the analysis of drugs and metabolites in biological fluids. The particle size is 30 μm and the optimal flow rate depends on the column diameter (0.8–3.0 ml/minute). The column can be used over a large pH range (2–12) and they can cope with mobile phases with organic solvents (e.g., methanol or acetonitrile) and buffers up to a concentration of 0.3 mol/l. The maximum pressure on the column should not exceed 10 MPa.

MSpak GF-4A columns remove high-molecular-weight substances using size exclusion. As they are packed with polyvinyl alcohol, they are much more efficient than the PK series as far as the removal of high-molecular-weight substances is concerned; nevertheless, if we compare them to PK series, they are less capable of retaining the hydrophilic substances. They are therefore not useful for the pre-concentrating hydrophilic substances, such as caffeine. The particle size is 9 μm .

Asahipak ODP-51 4B columns are packed with polymer-based gel bound with C-18 groups. Compared with the pre-treatment columns that are packed with C-18 bonded silica gel (e.g., ODS columns), ODP-51 4B can be used in a wider pH range (2–12). The particle size is 5 μm and the number of theoretical plates for these pre-columns exceeds 2000.

3. RAMs for direct analysis of biological samples

As explained previously, columns and pre-columns filled with RAMs have been recognized as a suitable tool for the direct injection of biological samples that contain proteins (entirely biological material), directly into the flow-analysis system. In the most basic chromatographic system using these packings, the sample is loaded directly into the mobile phase. In this type of system, there is both separation of the analytes from the proteins and separation of the analytes themselves. However, it is essential to use a mobile phase showing non-denaturing properties (i.e. with the content lower than 25% of acetonitrile, 20% of isopropanol and 10% of tetrahydrofuran, respectively). These percentage values characterize the beginning of protein denaturation; however, in practice, no more than 20% organic phase is used.

This is a real disadvantage as, under certain conditions, the analyte must have suitable retention on the column and the restrictions concerning the mobile phase significantly decrease the scale of applicability.

RAMs are much more frequent in multi-column chromatography systems using the column-switching technique. These systems enable simultaneous protein removal and analyte pre-concentration on the RAM pre-column, whereas the separation of low-molecular-mass analytes takes place on the analytical column with a common sorbent type. Restrictions concern only the mobile phase into which the biological sample is loaded. Of the several modes that can be used, back-flush column-switching is used most. Nevertheless, high demand on the devices (2 pumps and selection switching valve with synchronization unit) is considered a disadvantage.

RAM pre-columns could also be integrated into the "non-separative" flow systems of flow-injection analysis (FIA) or sequential-injection analysis (SIA). However, due to back pressure of RAM columns, their integration into FIA systems (using a peristaltic pump) is practically impossible. The syringe pump used for the commercial SIA analyzer reaches a pressure that allows the flow of mobile phase through a short RAM pre-column where the sorbent particle size is 20 μm or higher. The newly developed SIA-RAM technique could be used for simple screening analysis of drugs in biological material [14,15].

As mentioned above, RAMs have been developed as suitable tools for direct, repetitive injection of untreated biological samples into the analytical system, so they are ideal for automation, purification, and pre-concentration. Two approaches have already been described:

- direct mode or single column; and,
- column switching.

In the first type, the RAM column is directly connected to the detector. In this case, the support is used for extraction and separation. In the second type, the RAM pre-column extracts only and a switching valve connects it with an analytical column, where the separation is performed.

3.1. Direct mode

In the direct-mode configuration, the analytical procedure involves three steps:

1. sample extraction;
2. analyte elution; and,
3. re-equilibration of the extraction support.

First, the biological fluid is injected onto the extraction pre-column with an appropriate mobile phase. During this extraction step, analytes are retained by extraction onto sorbent, while endogenous components (mainly proteins) are eluted from the pre-column. Afterwards, analytes are eluted from the support to the detector. Finally, the pre-column is washed and the sorbent is

re-equilibrated with mobile phase, so that the pre-column is ready for the injection of another sample.

In accordance with the type of the detection, two different approaches have been used. RAM columns emerged in the middle of the 1980s when the UV spectrophotometer was by far the most commonly used detector for this type of analysis. Given the relatively low selectivity of UV detection, special attention has to be paid to the chromatographic effectiveness of these extraction supports.

More recently, MS detection has been used more widely for biological analysis; however, direct connection of a RAM column to MS detection is still quite rare.

3.2. Column switching

In recent decades, the column-switching configuration has proved useful for the determination of substances in biological matrices. The extraction support, used for the extraction and/or pre-concentration of the sample, is coupled to an analytical column via a selection valve, and it separates analytes before detection, for which an additional pump and switching valve are required (Fig. 2).

The switching valve is in position A during the extraction step. The sample is injected into the extraction pre-column with a stream of extraction mobile phase. Concurrently, the analytical column is adjusted for elution of the mobile phase. The valve is switched to the position B after elution of the matrix. Analytes are eluted from the extraction pre-column either in the back-flush or straight-flush mode using the analytical mobile phase and are transferred onto the analytical column. Afterwards, the valve is switched to its initial position (position A). Analytes are separated on the analytical column prior to detection. Simultaneously, the extraction pre-column is re-equilibrated by loading with mobile phase so that the system is ready for the next sample injection.

Column-switching configurations can contain various numbers of pre-columns, switching valves and pumps. Fig. 2 shows a simple column-switching configuration.

Recently, RAMs have been widely used in the column-switching configuration. Independent of the extraction support, this configuration offers increased selectivity and sensitivity while simultaneously decreasing analysis time.

3.2.1. Straight-flush and back-flush modes. The straight-flush mode is the simplest mode applied to processing of biological samples using the column-switching configuration. First, the sample is injected on the pre-column, where undesirable components are directly discharged to waste. By rotating the six-port selection valve, the fraction (containing the analytes that are being analyzed) is transmitted onto the analytical column and the analytes are separated. This configuration is called straight-flush mode and has been used for the analysis of drugs (e.g.,

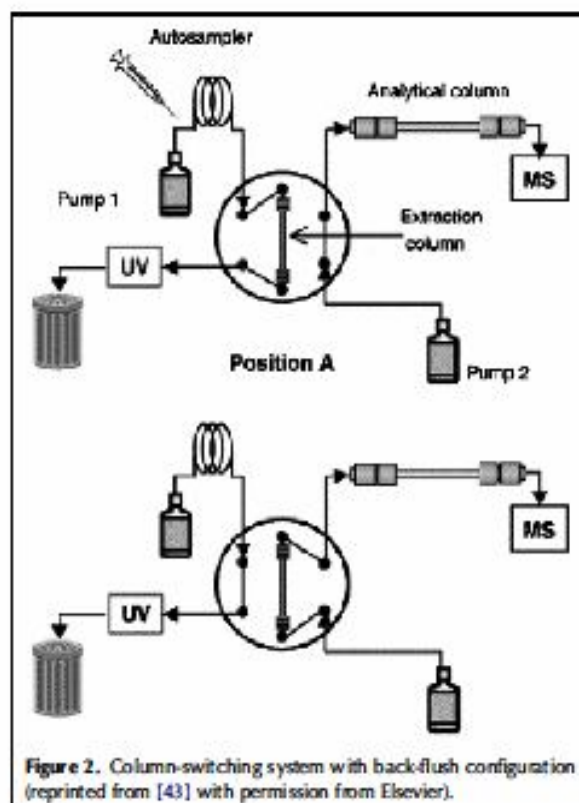


Figure 2. Column-switching system with back-flush configuration (reprinted from [43] with permission from Elsevier).

oxracetam, ofloxacin, aminopyrin, or adriblastin in various types of samples [16]).

The back-flush mode is carried out in direction of flow opposite to that of the analytical mobile phase through the pre-column. In this way, analytes retained on the pre-column front are directly transferred to the analytical column. After removing the fraction of interest, the powerfully retained components of the matrix may also be removed from the pre-column by reverse flow. In this approach, the analytical column is protected from contamination of components from the matrix, which are eluted later. The back-flush mode also minimizes peak broadening. To achieve this, an additional pumping system usually provides the stability required, as disturbance of the sorbent packing in the pre-column can occur by changing the direction of flow of the mobile phase. The back-flush mode has been used for separating and determining several antiarrhythmics, gastrointestinal medicines, antihypertensive drugs and antidepressants, as well as their related substances [17].

4. Sample preparation, types of samples and binding to proteins

Sample preparation remains the most serious problem for automating HPLC of biological samples due to the

high amounts of proteinaceous content that require pre-treatment. The analysis of untreated raw sample leads to irreversible adsorption of proteins to the column surface and mostly to their denaturation. Consequently, it considerably reduces both the efficiency of the chromatographic system and the lifetime of the analytical column.

It is therefore essential to treat the biological sample before injection into HPLC. The treatment mainly concerns the removal of the proteins present in the sample. For example, liquid-liquid extraction (LLE) has been used as a traditional off-line method for biological sample pre-treatment. However, this method is time consuming, inaccurate and hard to automate. In addition, consumption of organic solvents is high. LLE has therefore been replaced with solid-phase extraction (SPE), which uses cartridges restricted to one use only. Nevertheless, SPE has not proved to be sufficient. That is why the number of HPLC methods, including on-line sample pre-treatment and using the column-switching, have been growing in recent years.

Table 1 compares three types of sample pre-treatment:

- classical LLE;
- SPE; and,
- column switching.

It is apparent that the traditional preparation techniques include a great number of steps that can lead to considerable losses of analytes. Column-switching methods minimize the number of manual steps, and that increases the accuracy and the precision of the method. Moreover, it significantly shortens the time necessary for sample processing, so it also shortens the overall time for analysis.

Compared to the traditional sample-treatment techniques, column-switching is also advantageous as an internal standard is unnecessary because the accuracy and the precision of the method are increased. However, an internal standard can still prove useful if it is necessary to process a long sequence of the samples. Column-switching also protects light-sensitive analytes, as there is no light exposure due to sample pre-treatment. Table 2 summarizes all the main advantages and the disadvantages of using a column-switching system for analysis of biological materials.

Practically all liquid biological samples that have had suspended particles removed can be injected directly into the column-switching system, while solid samples need to be dissolved and homogenized. The matrix composition and the amount of injected sample determine the column lifetime. Biological fluids are

Table 1. Comparison of methods for preparing samples of biological material (LLE, SPE and column-switching technique)

Liquid-liquid extraction (LLE)	Solid-phase extraction (SPE)	Column switching
Sample dosing	Sample dosing	Possible centrifugation,
Internal standard addition	Internal standard addition	Filtration and/or sample
Organic solvent addition	Cartridge equilibration	dilution
Shaking	Sample application	Injection
Centrifugation	Matrix elution	Valve switching
Mixture partition	Analyte elution	
Possible re-extraction	Solvent vaporization	
Solvent vaporization	Re-dissolution	
Re-dissolution	Filtration	
Filtration	Injection	
Injection		

Table 2. Advantages and disadvantages of column-switching system during biological sample preparation

Advantages	Disadvantages
Minimal sample adjustment	Switching valves, extraction RAM columns and pumps required
On-line sample preparation	Compatible mobile phases required
Significant decrease in total analysis time	Regular pre-column exchange required
Possibility of full automation	
Higher accuracy and precision	
Improvement of the selectivity in combination with various chromatographic modes	
No necessity of internal standard	
Photo-labile analyte protection	
Low consumption of organic solvents	

Table 3. Usage of restricted-access materials (RAMs) in HPLC column-switching

Field of application	Matrix	Analyte(s)	Restricted-access material (RAM), producer	Ref.
Analysis of drugs and other biologically active substances in biological fluids	Human whole blood	Benzodiazepines and metabolites	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), particle size 25 μm, Merck, LiChrospher 60 XDS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[18]
	Human plasma	Cyproterone acetate	LiChrospher RP-4 ADS (2.5 × 2 mm), 25 μm, Merck	[19]
	Human urine	Verapamil and its metabolites	LiChrospher RP-8 ADS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[20]
	Human plasma	Sotalol	LiChrospher 60 XDS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[21]
	Human plasma	Meloxicam	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[22]
	Human plasma	Cloxacillin	LiChrospher 60 XDS (DEAE/diol) (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[23]
	Human serum	Furosemide	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[15]
	Human plasma	Rofecoxib	LiChrospher 60 RP-18 ADS (25 × 4 mm), 40–63 μm, Merck	[24]
	Human serum	Voriconazole	LiChrospher RP-8 ADS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[25]
	Human plasma	Caffeine and metabolites	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[26]
Human plasma	Cocaine and benzoylecgonine	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[27]	
Determination of antidotes	Human plasma	Atropine	LiChrospher 60 XDS (SO ₂ /diol) (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[28]
Veterinary analysis	Horse plasma	Ketoprofen enantiomers	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[29]
Identification of human plasmatic peptides with molecular weights up to 20 kDa	Human whole blood	Angiotensin 1 Angiotensin 2	LiChrospher 60 XDS (SO ₂ /diol) (25 × 4 mm), 25 μm, Merck, LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[30]
	Human whole blood Human urine	Peptides Drugs	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck, LiChrospher 60 XDS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[31]
	Human plasma Human urine	Enzymes Proteins Drugs	SCX-RAM (SO ₂ /diol) (2.5 × 2 mm) and (2.5 × 4 mm), 25 μm (LSP MDA, Merck)	[32]
Development of new drugs	Sheep serum Sheep plasma	Inhibitor of matrix metalloproteinases (MMPs)	LiChrospher RP-8 ADS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[33]
Purification of plasmid DNA	Cell lysate	Plasmid DNA (gene vector)	Q-Sepharose S-500 HR, –	[34]
Environmental monitoring	Human urine	1-, 2-naphthol	LiChrospher RP-8 ADS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[35]
	Human plasma	Organophosphorus triesters	LiChrospher RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[36]
	Human urine	Five major metabolites of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	LiChrospher RP-8 ADS (2.5 × 4 mm), 25 μm, Merck	[37]
	Drinking and surface water River water River sediment Wastewater	Steroid sex hormones Drugs Alkylphenolic surfactants	LiChrospher RP-4, RP-8 or RP-18 ADS (25 × 4 mm), 25 μm, Merck	[38]

(continued on next page)

Table 3 (continued)				
Field of application	Matrix	Analyte(s)	Restricted-access material (RAM), producer	Ref.
Food analysis	Fruits	Pesticides	Hisep SHP (50 × 4.6 mm), 5 μm,	[39]
	Water Soil	Herbicides	Supelco SPS-SPM-SS-100-C18 (50 × 4.6 mm), 5 μm, Regis Tech	
	Apple juice	Patulin	-	[40]
	Egg yolk	Cholesterol	BioTrap C18, protein-coated RP-18 pre-column, ChromTech	[41]
	Milk	Polyamines	LiChrosorb C18 (50 × 4.6 mm), 10 μm, Agilent	[42]

most problematic when they contain a high fraction of proteins and cells (blood, plasma and serum). Cerebrospinal and interstitial fluids, as well as urine, are generally more compatible with LC because they have lower protein content, so simple filtration can provide suitable pre-column stability. Other ways considered to prolong column lifetime include centrifugation, dilution, sample filtration, use of in-line filters and off-line analyte extraction. Proteins can also be precipitated and removed prior to injection to the chromatographic system. Lower efficiency than expected might be found where the drug is strongly bound to proteins. In such cases, significant discrepancies in recovery can be observed during analysis of identical kinds of samples. The main ways to exclude the drug from the binding site of protein is by diluting the sample or by adding organic solvent prior to injection onto the pre-column. The amount of the organic solvent added depends on the polarity and the nature of the denaturation of the solvent.

5. RAMs in analytical instrumentation

In practice, RAMs have been used for only a few years. Most publications on RAMs [18–27] concern the determination of drugs and other biologically-active substances in body fluids. Almost 70% of all cases refer to plasma analysis, followed by serum (13%), urine (3.3%) and whole blood (3.3%). Other types of biological material (e.g., saliva, hair, microdialysate, and liver tissue) are used only rarely.

Other publications have dealt with the determination of antidotes in biological material [28], veterinary determinations of drugs [29], identification of human-plasma proteins (approx. 9% of publications) [30–32], research into new drugs [33] or DNA-plasmid cleaning [34].

Environmental monitoring has seen the second greatest use of RAMs, with approximately 21% of published articles [35–38]. Pollutants are either determined directly in the environment (i.e. drinking water, river

water or wastewater and soil (54%)) or in body fluids (mostly in plasma and urine, 46%) of people who had previously been exposed to contaminants.

Food analysis forms around 12% of publications, with determination of contaminants in wines, milk, juices, sea fish, fruit and vegetables.

Several examples of the uses of RAMs are presented in Table 3 [18–42], which includes the field of application, the type of matrix, the analyte determined, the type of RAM that was used, the producer and references.

Pre-columns of LiChroCART, filled with RAM material LiChrospher RP-18 ADS, were extraction pre-columns used most in analyzing drugs and other biologically-active substances in body fluids. These pre-columns are suitable for the analysis of plasma, serum, whole blood, urine or saliva samples. Only a few drugs were extracted on ion-exchange XDS pre-columns.

Ion-exchange pre-columns were the most often used in analyzing human-plasma proteins in sizes up to 20 kDa.

LiChroCART with LiChrospher RP-18 ADS material as sorbent was also used most often in the pre-column in environmental analysis.

In food analysis, less common pre-columns packed with sorbent with C18 functional groups were used.

6. Advantages and disadvantages of RAMs

To compare the performance of RAM sorbents with common SPE sorbents, we can apply several parameters, such as lifetime, separation efficiency, protein and analyte recovery, as well as the influence of LOD or mistakes occurring during off-line sample adjustment.

The lifetime of the sorbent is the most important factor for sorbent comparison, and, when comparing common SPE sorbent with RAM sorbent, RAM lifetimes are extremely high. The price of RAM columns is usually high and frequently exceeds the price of a common analytical column; however, most of the RAM sorbents have a theoretical lifetime of injection of 100 ml of human plasma, so, if 50 μl is injected, it means that it is possible

to achieve 2000 analyses without any change in recovery, separation performance and back-pressure, whereas commercial SPE cartridges are designed for one use only.

Analysis using RAM sorbents is also cheaper than analysis with traditional pre-treatment. In traditional extraction techniques, the costs for experienced laboratory staff capable of dealing with the complicated procedures must be included; these procedures are time consuming and consume organic solvents. However, it is essential to have more a complex chromatographic system with higher demands on instrumentation and staff available for on-line preparation and analysis of the sample.

The separation efficiency of RAM columns mainly depends on their type. For example, SPS columns have the highest efficiency (up to 60,000 theoretical plates). However, alkyl-diol ADS stationary phases (particle size 25 µm) have significantly lower efficiencies.

Protein and analyte recovery of RAM sorbents is practically 100%. Protein recovery means the percentage of protein injected that is eluted from the column. Where on-line RAM coupling is used in a system (i.e. direct injection of the sample), the analytes are not lost during pre-treatment. However, partial loss of analytes can be observed with drugs strongly bound to plasmatic proteins, especially to albumin.

The LOD might be decreased if the amount of the injected sample is increased. The amount of the sample in a simple chromatographic system is restricted by the capacity of the chromatographic column, whilst the amount of the sample in the column-switching system is virtually unlimited and depends only on the technical parameters of the system. With direct injection of raw sample, the errors caused by people during sample manipulation are significantly reduced. At the same time, "safe" manipulation of dangerous or infectious samples is surely a great advantage of this method.

7. Conclusion

The long lifetime, fast analysis, easy automation and simplification of the whole analytical procedure are major points in favor of using RAMs in HPLC analytical systems. Some of the most frequently published analytical work these days is on the analysis of drugs in biological material (e.g., plasma, serum, urine, and liquor). Using traditional manual techniques (LLE and SPE), it is often extremely difficult and time consuming to remove proteins and avoid the loss of analytes; and, large series of samples are almost impossible. RAMs as extraction pre-columns in a column-switching mode for HPLC offer the best prospects for the future, as this allows direct injection of previously unprepared biological material

into the HPLC system. Apart from removing bio-matrix from the sample, the RAM allows isolation and pre-concentration of analytes, and, as the sample preparation is carried out on-line, there is virtually no loss of analytes.

RAM systems are especially useful for high-throughput sampling in biochemistry, and environmental and food analysis, where automation is essential. As no manual sample treatment is needed, the analysis is rapid and the work of an analyst is simplified and safer (especially in the cases of potentially infectious samples of biological material).

Compared to traditional SPE sorbents, RAM sorbents have many advantages, including longer lifetime, higher separation efficiency, higher analyte recovery, reduced analyte losses, lower organic waste production, lower total costs per analysis, and a lower risk of error by laboratory staff.

It is obvious that RAMs bring considerable advantages and that their usage in analytical practice will certainly extend in the future.

Acknowledgements

The authors acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Health Project No. IGA MZ CR 1A/8689-4 and Project No. IGA MZ NR 9103-4/2006.

References

- [1] I.H. Hagestam, T.C. Pinkerton, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1757.
- [2] J. Haginaka, J. Wakai, *Chromatographia* 29 (1990) 23.
- [3] D.E. Williams, M.P. Kabra, *Anal. Chem.* 62 (1990) 807.
- [4] T. Kanda, H. Kutsuna, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr., A* 672 (1994) 51.
- [5] T.C. Pinkerton, *J. Chromatogr., A* 544 (1991) 13.
- [6] S.E. Cook, T.C. Pinkerton, *J. Chromatogr., A* 368 (1986) 233.
- [7] S. Vielhauer, A. Rudolph, K.S. Boos, D. Seidel, *J. Chromatogr., B* 666 (1995) 315.
- [8] D.J. Gluch, B.T. Hunter, B. Feibush, *J. Chromatogr., B* 433 (1988) 264.
- [9] B. Feibush, C.T. Santasania, *J. Chromatogr., A* 544 (1991) 41.
- [10] N. Nimura, H. Itoh, T. Kinoshita, *J. Chromatogr., A* 689 (1995) 203.
- [11] J. Haginaka, *Trends Anal. Chem.* 10 (1991) 17.
- [12] C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, *J. Chromatogr., A* 544 (1991) 25.
- [13] J. Hermansson, A. Grahn, *J. Chromatogr., A* 660 (1994) 119.
- [14] D. Šatínský, H. Šklenářová, J. Huclová, R. Karlíček, *Analyst (Cambridge, U.K.)* 128 (2003) 351.
- [15] J. Huclová, D. Šatínský, T. Mata, R. Karlíček, P. Solich, A.N. Araújo, *J. Chromatogr., A* 1087 (2005) 245.
- [16] J.B. Lecaillon, C. Souppart, F. Le Duigou, J.P. Dubois, *J. Chromatogr.* 497 (1989) 223.
- [17] E. Takahara, H. Fukuoaka, T. Takagi, O. Nagata, H. Kato, *J. Chromatogr.* 576 (1992) 174.
- [18] M. Waller, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr., A* 1025 (2004) 85.
- [19] B. Christiaens, M. Pilet, P. Chiap, O. Rbeida, A. Ceccato, B. Streed, J. De Graeve, J. Crommen, Ph. Hubert, *J. Chromatogr., A* 1056 (2004) 105.

- [20] W.M. Mullett, M. Waller, K. Lessen, J. Borlak, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr., B* 801 (2004) 297.
- [21] O. Rbeida, B. Christiaens, P. Chiap, Ph. Hubert, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 829.
- [22] W. Baeyens, G. Van der Weken, E. D'haenlck, A.M. Garcia-Campaña, T. Vanketsbilck, A. Vercouteren, P. Deprez, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 839.
- [23] O. Rbeida, P. Chiap, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, Ph. Hubert, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 961.
- [24] A. Vintiloiu, W.M. Mullett, R. Papp, D. Lubda, E. Kwong, *J. Chromatogr., A* 1082 (2005) 150.
- [25] H. Egle, R. Trittler, A. König, K. Kümmerer, *J. Chromatogr., B* 814 (2005) 361.
- [26] J.P. Lambert, W.M. Mullett, E. Kwong, D. Lubda, *J. Chromatogr., A* 1075 (2005) 43.
- [27] R. Brunetto, I. Gutierrez, Y. Delgado, M. Gallignani, J.L. Burguera, M. Burguera, *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 534.
- [28] O. Rbeida, B. Christiaens, Ph. Hubert, D. Lubda, K.S. Boos, J. Crommen, P. Chiap, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36 (2005) 893.
- [29] W. Baeyens, G. Van der Weken, J. Haustraete, H. Aboul-Énein, S. Corveleyn, J.P. Remon, A.M. Garcia-Campaña, P. Deprez, *J. Chromatogr., A* 871 (2000) 153.
- [30] P.M. Musteata, M. Waller, J. Pawliszyn, *Anal. Chim. Acta* 537 (2005) 231.
- [31] M. Waller, Y. Gu, C. Dartiguenave, P.M. Musteata, K. Waldron, D. Lubda, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr., A* 1067 (2005) 197.
- [32] O. Willemssen, E. Machtejevas, K. Unger, *J. Chromatogr., A* 1025 (2004) 209.
- [33] P. Chiap, M. Plette, B. Evrard, F. Franckenne, B. Christiaens, G. Piel, D. Cataldo, J.M. Foidart, L. Delattre, J. Crommen, Ph. Hubert, *J. Chromatogr., B* 817 (2005) 109.
- [34] P. Gustavsson, R. Lemmens, T. Nyhammar, P. Busson, P. Larsson, *J. Chromatogr., A* 1038 (2004) 131.
- [35] R. Preuss, J. Angerer, *J. Chromatogr., B* 801 (2004) 307.
- [36] N. Amiri, C. Crescenzi, *J. Chromatogr., B* 795 (2003) 245.
- [37] R. Preuss, H.M. Koch, J. Angerer, *J. Chromatogr., B* 816 (2005) 269.
- [38] M.L. de Alda, S. Diaz-Cruz, M. Petrovic, D. Barceló, *J. Chromatogr., A* 1000 (2003) 503.
- [39] E. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr., A* 892 (2000) 435.
- [40] M. Takino, S. Daishima, T. Nakahara, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1965.
- [41] S. Emara, S.A. Hussein, F.A. Mohamed, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 22 (1999) 1235.
- [42] P. Bellagamba, V.M. Moretti, T. Mentastì, A. Albertini, U. Iazzana, P. Vallfrè, *J. Chromatogr., A* 791 (1997) 79.
- [43] S. Souverein, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr., B* 801 (2004) 141.

Příloha II

Petr Sadílek, Dalibor Šatínský Martin Ořapka, Radek Sladkovský a Petr Solich:

Rapid and simple determination of vitamin A and vitamin E in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography, Current Analytical Chemistry 5 (2009) 311-315

Rapid and Simple Determination of Vitamin A and Vitamin E in Human Plasma by Column-Switching High-Performance Liquid Chromatography

Petr Sadilek, Dalibor Šatinský*, Martin Ořapka, Radek Sladkovský and Petr Solich

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic

Abstract: In this contribution, the rapid and simple determination of vitamins A and E, and vitamin E acetate as internal standard in human plasma by high-performance liquid chromatography with a column-switching technique was proposed. Restricted Access Material - RAM column 25 x 4 mm containing 25 µm C18 alkyl-diol silica support was integrated into lab-made column-switching HPLC system. A monolithic column Chromolith Performance RP-18e, 100 x 4.6 mm, (Merck) was used for simple separation of vitamins in gradient mode.

The mobile phase I: methanol - 20 mM water solution of dodecyl sulfate sodium salt (30:70, v/v) was used for protein matrix elution, flow rate 1.3 ml min⁻¹. Valve switching time was determined to 4 minutes after sample injection.

The gradient elution of mobile phase II: methanol - water 90:10 (v/v) → 100% methanol, flow rate 1.0 ml min⁻¹ was used as optimal condition of vitamins separation in relatively short time. Analysis time from raw sample to peaks evaluation was less than 15 min. UV detection was carried out at wavelength 285 nm.

The recoveries of vitamins from spiked human plasma were 102.5% for vitamin A and 91.4% for vitamin E. Limits of detection were 0.24 µmol l⁻¹ and 0.84 µmol l⁻¹ for vitamin A and E, respectively.

Keywords: Vitamin A, Vitamin E, Vitamin E acetate, Column-switching, Restricted Access Material (RAM), HPLC.

1. INTRODUCTION

Fatty vitamins such as vitamin A (A) and vitamin E (E), and its analogues play various important roles in the growth, metabolism and antioxidation of living organisms. Recently, such fatty vitamins are attracting interest not only as a nutrient in food chemistry but also as a preventive of cancer, aging and other diseases in medicine [1].

High-performance liquid chromatography (HPLC) is one of the most powerful tools for determining fat soluble vitamins and has been widely utilized for their separation [1-8]. Before sample injection in chromatographic methods, analytes have to be extracted from sample matrix such as serum, plasma, internal organs or food, with organic solvents and followed by centrifuging and concentrating prior to apply to the HPLC system. These processes are time-consuming, problematic, organic waste producing and can result in serious human error. Another possibility of sample pre-treatment is using solid phase extraction (SPE) as a modern approach in bio-fluids analysis [9]. SPE can be performed off-line, the sample preparation being separated from the subsequent chromatographic analysis, or on-line by direct connection to the chromatographic system [9, 10]. On-line techniques do not require further handling of the samples between the analyte enrichment and the separation step and, therefore are highly suitable for fully automated techniques, which can be used on-site.

Hyphenation and column-switching is the trend of last 10 years [11-13] and nowadays special attention is given to on-line SPE-LC followed with various detection modes, which represents a fast, modern and reliable approach of bio-fluids analysis. Important advantages of column switching techniques are a decrease of the risk of the sample contamination, the removal of analyte losses by evaporation and finally the transfer and analysis of the totality of the extracted species. In contrast to off-line SPE where only an aliquot of the extract is injected into the chromatograph, the analysis of the complete sample allows the sample volume to be dramatically reduced.

The development of special and selective extraction supports, allowing the direct and multiple injections of biological matrices, is an attractive means to reduce the sample preparation time. Among different supports, restricted access materials (RAM) and large particles supports (LPS) are considered, nowadays, as the most popular extraction materials [11]. These different extraction supports possess the common property of excluding macromolecules while analytes are generally retained by hydrophobic or electrostatic interactions. Connected to an analytical column in a column-switching configuration, these special extraction supports allow automating, simplifying and speeding up of the sample preparation step. Applications of these extraction supports in single column and column switching configurations, for the direct analysis of compounds in various biological fluids were presented by our group and S. Sourverain *et al.* in wide review [11, 14].

*Address correspondence to this author at the Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, Hradec Králové 500 05, Czech Republic; Tel: +420495067228; Fax: +420495067164; E-mail: satinsky@faf.cuni.cz

The aim of the present work was to develop and validate a simple and well-controlled analytical tool for the determination of vitamin A, vitamin E and vitamin E acetate as internal standard in human plasma. To our best knowledge, no such analytical method has previously been provided for the determination of these compounds simultaneously. Only the work of Moriyama *et al.* [1] has described determination of vitamins A and E in serum with surfactant as a diluent by column-switching high-performance liquid chromatography. In comparison to the work [1], our proposed method showed short time of analysis (less than 15 min), internal standard vitamin E acetate was used, and method was validated.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Instrumentation

The HPLC system, consisting of a binary gradient pump LCP 4100 (Ecom, Prague) for analytical mobile phase, and LCP 3001 Micropump (Lab. Instruments, Prague) for sample pre-treatment and washing eluents, Waters autosampler 717 plus, variable wavelength UV detector Waters 486 (Waters, Milford, MA) and a PC for data processing, was controlled by chromatographic software CSW v.1.7 for Windows (Data Apex s.r.o., Prague). Column switching system with program control unit was lab-made created and consisted of 6-port low-pressure selection valve (Cheminert NCW 0087, VICI Valco Instruments Co., USA). Timing of the control unit (two position actuator control module, VICI Valco Instruments) for selection valve was performed via PC (RS 232 interface). Analysis were performed on the monolithic column Chromolith Performance RP-18e, 100 × 4.6 mm, (Merck, Germany) in gradient mode. Biological sample pre-treatment was performed on the LiChrospher® RP-18 ADS column (25 µm, 25 × 4 mm). The RAM column was integrated into the chromatography device in the back-flush mode.

2.2. Reagents

All chemicals used were of analytical grade quality. The standard retinol (A), (purity 98%), α -tocopherol (E), (purity 98%) and α -tocopherol acetate (Eac), (purity 98%) were purchased from Fluka (Czech Republic). All organic modifiers for mobile phases and samples preparation and dodecyl sulfate, sodium salt (SDS; 98%) were obtained from Sigma-Aldrich. The standards of control serum Lyonorm U were purchased from Lachema Brno (Brno, Czech Republic). Real samples of human plasma were provided Faculty Hospital, Charles University, Hradec Králové. Millipore Milli-Q RG (Millipore s.r.o., Prague, Czech Republic) ultra pure water was used for preparing the solutions. Mobile phases were degassed by helium before use.

2.3. Method and Sample Preparation

2.3.1. Standard Solutions, Calibration Curves and Quality Control Samples

The stock vitamins solutions (A, E, Eac) were prepared separately by solving each concentrated standard solutions to final concentration 1000 µmol L⁻¹ in methanol. These stock solutions were stored in brown bottles at 4°C in dark. The working standard solutions 50 µmol L⁻¹ and the next working

concentrations were obtained by diluting the stock solution in organic diluent mixture. The organic diluent mixture for standard samples and quality control serum samples was prepared by mixing 60 ml of isobutanol and 40 ml of isopropanol.

Standard solutions for calibration curves were prepared by mixing 500 µl portions of the vitamin standard solutions in methanol or spiked serum samples and 500 µl portions of organic diluent mixture in a brown glass vials. The standard calibration curves and matrix calibration curves were prepared in concentrations 20, 15, 10, 5, 2.5, and 0.8 µmol L⁻¹ for A, and in concentrations 50, 25, 12.5, 6.25, 3.0 µmol L⁻¹ for E and Eac, respectively.

2.3.2. Sample Preparation

The spiked solutions were prepared by mixing 300-µl portions of standards in organic diluent mixture (isobutanol: isopropanol (60:40, v/v)) and 300-µl portions of fresh human plasma for recovery study. The standard solutions were prepared in the same procedure except using methanol instead of human plasma. For the serum blank sample, 300 µl of organic diluent mixture (isobutanol:isopropanol (60:40, v/v)) and 300 µl of control serum Lyonorm U were mixed. These diluted solutions were centrifuged for 15 min at 1750 × g. The supernatant was used for the analysis. The recovery was measured at two concentration levels (10 and 1.7 µmol L⁻¹) for A and at levels 30 and 15 µmol L⁻¹ for E.

2.3.3. Mobile Phases

The two different mobile phases were used for target analyte separation and on-line sample preparation in column switching system.

The mobile phase I: methanol – 20 mM water solution of dodecyl sulfate sodium salt (30:70, v/v) was used for sample injection and for protein matrix elution, flow rate 1.3 ml min⁻¹. The mobile phase II (gradient elution): methanol – water 90:10 (v/v) → 100% methanol, flow rate 1.0 ml min⁻¹ was used for vitamins separation. The valve switching time was determined to 4 minutes after sample injection.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chromatography Procedure

As mentioned in the previous works [1-8], methanol has been largely used for elution of vitamins E and A from C-18 columns. Here, the best separation profile was obtained by using a linear methanol gradient ranging in 7 min from 90% methanol (10% of water) to 100% methanol in 9 min. The total analysis time was 15 min under the mentioned conditions including sample pre-treatment on ADS column. A typical chromatogram is shown in Fig. (1). Flow rate of the analytical mobile phase (mobile phase II) was 1.0 ml min⁻¹. The time range between the sample extraction on the ADS column and start of the separation analysis was used for analytical column equilibration after the gradient elution.

The mobile phase I - methanol – 20 mM water solution of dodecyl sulfate sodium salt (30:70, v/v) was used for sample loading on ADS column and for protein matrix elution; flow rate of pre-treatment mobile phase was 1.3 ml min⁻¹. The basic step of the direct pre-treatment procedure (loading

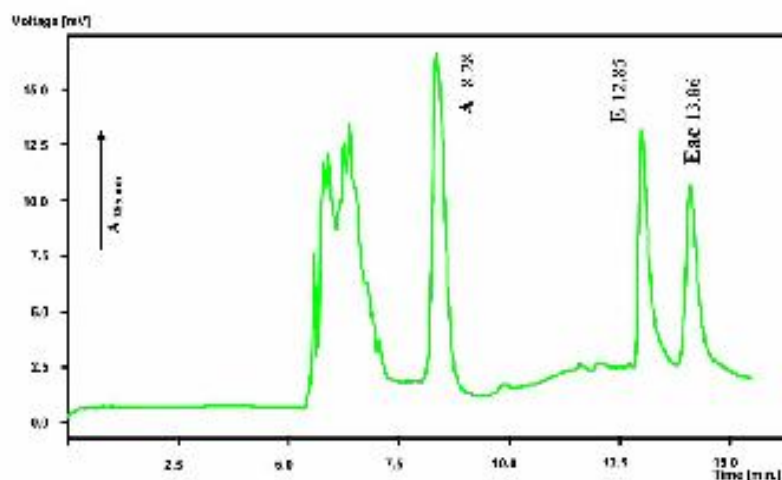


Fig. (1). Chromatogram of vitamins A, E and Eac as internal standard in human plasma sample by column switching HPLC. Conditions: analytical mobile phase: gradient elution: methanol – water 90:10 (w/v) → 100% methanol, flow rate 1.0 ml min⁻¹; pretreatment mobile phase: methanol – 20 mM water solution of SDS (30:70, v/v), flow rate 1.3 ml min⁻¹, injection volume 50 μl, UV detection at wavelength 285 nm. Other conditions are described in Section 3.1.

of the sample and removing the protein matrix from the ADS column) was considered to finish when the detector had reached the baseline. Removing of the proteinaceous ballast was monitored using the UV spectrometric detector at 285 nm. The valve switching time was determined to 4 minutes after sample injection. The injection volume was 50 μl portions of diluted standards, spiked and human plasma samples. Continuous analysis with the autosampler was carried out over an 15-min interval.

3.2. Addition of Surfactant to Mobile Phase

As the usual eluents for protein matrix elution from the column are used mixtures of organic solvents with water. The content of organic phase is usually limited to 20 – 25 % because of the risk of proteins denaturation and clogging the system. However, in this case vitamins showed insolubility in this weak organic – water mobile phase. It resulted in the retention of vitamins inside the valve switching system and low responses were obtained after standards injection. The effect of surfactant, which has been tested as a solubilizing reagent against proteins precipitation, on recovery was examined for the purpose of eliminating vitamins insolubility in eluent. The using of surfactant addition was described in previous work [1], mainly alkyl sulfates showed excellent results, especially in the case of SDS. The tested concentrations of the SDS in pretreatment mobile phase were in the range 20 – 50 mM of SDS in water phase. The appropriate concentration of SDS in a diluent was 20 mM. The addition of SDS in concentration 20 mM shows no effect on the retention times of vitamins and column stability.

3.3. Dilution of Biological Samples with Organic Solvent

Dilution of plasma samples with an aqueous solution is used for lowering viscosity of sample solutions and to prevent protein precipitation. In the case of diluting the vitamin standard solutions with water, no recoveries of A and E were

observed as they existed as oily drops in the eluent when passing through the pre-treatment column. This effect was described in the work of Moriyama [1]. Diluent solution containing organic phase must be add to biological sample to increase recoveries of vitamins from plasma. Nevertheless, a highly concentrated alcohol diluent solutions (more than 30% concentrations of alcohol), can cause formation of an insoluble precipitate in the serum or plasma samples. It was described that fatty soluble vitamins, especially A, are strongly bound to retinol-binding protein in blood [15]. Bigger volume of alcohol in the diluent (more than 50%, v/v) in combination with SDS in pretreatment mobile phase were sufficient to eliminate A and E from plasma protein matrix. In this case, suitable plasma sample dilution in ratio 1:1 with diluent mixture (isobutanol:isopropanol (60:40, v/v)) was found to be optimal for high recoveries of vitamins. Short centrifugation of the plasma samples was necessary due to the precipitation of plasma in diluent mixture. The supernatant was used directly for the analysis.

3.4. Validation of the Method

The method was validated with respect to the linearity, precision, accuracy, selectivity and sensitivity in order to evaluate the reliability of the results provided by the method. Obtained validation results and chromatography system suitability parameters are summarized in Table 1.

3.4.1. Calibration and Sensitivity

The calibration curve was established by measuring the absorbance signal of five solutions of various concentrations of vitamins in methanol. The linear relations between absorbance signal and concentrations of vitamins were found in the range 0.80-20 μmol L⁻¹ for A and in the range 3.0-50 μmol L⁻¹ for E and Eac, respectively. The linear relations were described by the following equations: for A: $A = (28.8098 \pm 0.2783)c + (2.6773 \pm 2.6235)$, where A is the

Table 1. HPLC System Suitability Parameters and Method Validation Results

	A	E	Eac
Retention time (min)	8.28	12.85	13.86
Peak resolution	10.673	2.516	
Peak symmetry	1.774	3.222	1.333
Number of theoretical plates	4604	15888	14257
Standard calibration - range ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^a	0.80 - 20	3.0 - 50	3.0 - 50
Correlation coefficient	0.9998	0.9988	0.9977
Matrix calibration - range ($\mu\text{mol L}^{-1}$) ^b	0.80 - 20	3.0 - 50	3.0 - 50
Correlation coefficient	0.9980	0.9982	0.9974
Limit of detection ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.24	0.84	0.88
Limit of quantification ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	0.80	2.80	2.93
Method precision (%) ^c c_1 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	3.46	3.45	3.11
c_2 ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	5.51	4.62	4.20
Accuracy - Spike recovery (%) ^d	95.5 - 102.5	88.4 - 91.4	

^a Each concentration of calibration standard was measured in triplicate.

^b Each concentration of serum matrix calibration standard was measured in triplicate.

^c Relative standard deviation (R.S.D.) values were calculated for intra-day repeated spiked plasma sample injections ($n = 6$) at two concentration levels $c_1 = 1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $c_2 = 10 \mu\text{mol L}^{-1}$ for A, and at levels $c_1 = 5.0 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $c_2 = 30 \mu\text{mol L}^{-1}$ for E and Eac, respectively.

^d Spiked sample solutions ($n = 6$) at two concentration levels c_1 and c_2 , two injection of each preparation.

absorbance at 285 nm and c the analyte concentration, the correlation coefficient was 0.9998; for E: $A = (3.7709 \pm 0.0908)c + (3.6989 \pm 2.1405)$, the correlation coefficient was 0.9988; for Eac: $A = (3.9655 \pm 0.1575)c + (1.0071 \pm 4.0655)$, the correlation coefficient was 0.9977. The matrix calibration curve was measured at same concentration levels in spiked serum samples. The linear relations were described by the following equations: for A: $A = (26.1376 \pm 0.8222)c + (17.7541 \pm 7.7517)$, the correlation coefficient was 0.9980; for E: $A = (3.8193 \pm 0.1044)c + (23.8402 \pm 2.4611)$, the correlation coefficient was 0.9982; for Eac: $A = (2.7644 \pm 0.0995)c + (1.8994 \pm 2.3452)$, the correlation coefficient was 0.9974.

The limit of detection and limit of quantification were calculated by the comparison of the three-fold (3σ) and 10-fold (10σ) variation, respectively, of base-line noise and signals of plasma samples spiked with known concentrations of vitamins. The detection limits were $0.24 \mu\text{mol L}^{-1}$ for A, $0.84 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0.88 \mu\text{mol L}^{-1}$ for E and Eac, respectively; the limits of quantification were estimated to be $0.80 \mu\text{mol L}^{-1}$ for A, $2.80 \mu\text{mol L}^{-1}$ and $2.93 \mu\text{mol L}^{-1}$ for E and Eac, respectively.

3.4.2. Precision

Precision of the proposed procedure was characterised by parameter of repeatability, which was calculated for six consecutive measurements at two concentration levels (10 and $1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ for A) and (30 and $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ for E and Eac, respectively) of vitamins in spiked plasma samples. The re-

sults in form of RSD were determined in the range 3.11 - 5.51%.

3.4.3. Accuracy

Accuracy of the method was estimated using the parameter of recovery. The recovery of vitamins was calculated at two concentration levels (10 and $1.7 \mu\text{mol L}^{-1}$ for A) and (30 and $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ for E) in spiked plasma samples by comparison of the responses of vitamins from spiked plasma samples with those found by injection of the standard solutions at the same concentrations. The mean absolute recoveries at two concentration levels were 102.5% and 95.5% for A; 91.4% and 88.4% for E. The mean extraction efficiency was relatively constant for vitamins over the range mentioned above ($\text{RSD} < 5.00\%$). The low extraction efficiency was observed for E. This effect was probably caused of higher lipophilicity of E, or E could be partially bound to proteins in plasma.

CONCLUSION

This work was focused on direct determination of fatty soluble vitamins in human plasma by using a column-switching HPLC technique. The LiChrospher[®] RP-18 ADS column was used for on-line plasma sample pre-treatment and deproteination. The use of dodecyl sulfate sodium salt in pre-treatment mobile phase and dilution of human plasma with mixture of (isobutanol:isopropanol (60:40, v/v)) have improved recoveries of A and E from the human plasma samples. The total analysis time within 15 min was achieved and human intervention was minimised in this method. Repeated injections of untreated bio fluids are possible; the

procedure ensures quantitative removal of protein matrix and on-column enrichment of the vitamins. The reusability of the RAM column drastically reduces cost of the analyses. The proposed method involving sample preparation can be simply automated and shows the possibility of restriction of manual sample handling. Minimum manipulation of the biological sample results in improved precision and accuracy, shorter analysis time, lower costs per analysis and lower bio-hazard. Method was used for vitamin A and vitamin E plasma level determination of real patients from faculty hospital. The found levels were in physiological range.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors acknowledge the financial support of the Czech Ministry of Education project no. MSM 0021620822.

REFERENCES

- [1] Moriyama, H.; Yamasaki, H.; Matsumoto, S.; Adachi, K.; Katsura, N.; Onimaru, T. Rapid determination of vitamins A and E in serum with surfactant as a diluent by column-switching high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1998, 798, 125-130.
- [2] Mata-Granados, J.M.; Luque de Castro, M.D.; Quesada, J.M. Fully automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D-3 hydroxyvitamins, and Vitamins A and E in human serum by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, 35, 575-582.
- [3] Heudi, O.; Trisconi, M.J.; Blake, C.J. Simultaneous quantification of Vitamins A, D-3 and E in fortified infant formulae by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2004, 1022, 115-123.
- [4] Barbas, C.; Castro, M.; Bonet, B.; Viana, M.; Herrera, E. Simultaneous determination of vitamins A and E in rat tissues by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1997, 778, 415-420.
- [5] Scalia, S.; Randa, A.; Ruberto, G.; Bonina, F.; Manegatti, E. Assay of vitamin-A palmitate and vitamin-E acetate in cosmetic creams and lotions by supercritical-fluid extraction and HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, 13, 273-277.
- [6] Epler, K.S.; Ziegler, R.G.; Craft, N.E. Liquid-chromatographic method for determination of carotenoids, retinoids and tocopherols in human serum and in food. *J. Chromatogr.*, 1993, 619, 37-48.
- [7] Lee, B.L.; Chua, S.C.; Ong, H.Y.; Ong, C.N. High-performance liquid chromatographic method for routine determination of vitamin-A and vitamin-E and beta-carotene in plasma. *J. Chromatogr. B*, 1992, 581, 41-47.
- [8] Yardim-Aksaydin, S.; Ozkan, Y.; Ozkan, E.; Torun, M.; Simsek, B. The role of plasma thiol compounds and antioxidant vitamins in patients with cardiovascular diseases. *Chin. Chem. Acta*, 2003, 338, 99-105.
- [9] Hennion, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1999, 856, 3-54.
- [10] Fritz, J.S.; Dumont, P.J.; Schmidt, L.W. Methods and materials for solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A*, 1995, 691, 133-140.
- [11] Souverain, S.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis. *J. Chromatogr. B*, 2004, 801, 141-156.
- [12] Bovanová, L.; Brandtšarová, E. Direct analysis of food samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 2000, 880, 149-168.
- [13] Fried, K.; Wainer, I.W. Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: Why, how and when. *J. Chromatogr. B*, 1997, 689, 91-104.
- [14] Sedláček, P.; Šattnsky, D.; Solich P. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices. *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26, 375-384.
- [15] Sporn, M.B.; Roberts, A.B.; Goodman, D.S. *The Retinoids*, Academic Press: New York, 1984; vol. 2, p. 41.

Příloha III

**Lucie Nováková, Milan Bláha, Petr Sadílek, Dalibor Šatínský,
Petr Solich, Vladimír Bláha, Dagmar Solichová, Radovan
Malý, Stanislav Filip a Jaroslav Malý:**

**Pharmacodynamic of statins – development of the method for
their determination in biological material, Ateroskleróza 11
(2007) 100-106**

PHARMACODYNAMIC OF STATINS – DEVELOPMENT OF THE METHOD FOR THEIR DETERMINATION IN BIOLOGICAL MATERIAL

Nováková, L., *Bláha, M., Sadílek P., Šatínský D., Solich P., *Bláha, V., *Solichová, D., Malý, R.,
*Blažek, M., Filip, S., *Malý, J.

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Hradec Králové,
Czech Republic*

**Faculty Hospital and Medical Faculty, Charles University, Hradec Králové, Czech Republic*

Introduction Patients with severe form of familiar hypercholesterolemia (FH) are treated with maximally tolerable doses of statins besides of diet and lifestyle change. A group of 12 patients has been observed in a long-term study (7.2 ± 2.96 years). Moreover repeated extracorporeal elimination of LDL-cholesterol was necessary at these patients. Such procedures could influence a blood level of statins and thus reduce their therapeutic effect. The aim of this work was to develop a method for their determination in biological fluids.

Method Two modifications of HPLC method (high performance liquid chromatography) with various types of detection (UV spectrophotometric and fluorescence) were tested and subsequently one GC (gas chromatography) approach and UPLC-MS/MS method (hyphenation of ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry) were examined.

Results UPLC-MS/MS method using specific SRM (selected reaction monitoring) experiment enables to achieve high sensitivity and selectivity of the determination with excellent reproducibility during a very short period of time.

Conclusion A new UPLC-MS/MS method for the determination of atorvastatin and simvastatin as most widely used drug in the treatment of FH was described. The method is available, fast and precise. It is convenient, after some modifications, for the determination of other statins, for pharmacodynamic studies and dosage adjustments in order to reach the best treatment effect as well.

Key words: atorvastatin, simvastatin, UPLC-MS/MS, LDL-apheresis, hemopheresis, atherosclerosis

Introduction

The mortality linked with cardiovascular diseases makes 52.4% in Czech Republic and it is relatively stabilized similarly as in other Western countries where invasive investigations are highly available [24]. Statins – so called penicillins of our age – they have decreased the mortality associated with cardiovascular diseases significantly (about 30-40%) [14]. Patients with severe form of heterozygous familiar hypercholesterolemia and all homozygous patients must take maximally tolerable doses of statins, often in combination with other drugs, besides of dietary and lifestyle changes. Their metabolism however could be aggravated in a different rate (according to the chemical structure), especially liver parenchyma could be endangered. It is necessary to know exactly the pharmacokinetics of statins in order to be able to benefit maximum efficiency of the therapy at the respectable level of adverse effects.

Using conventional standard therapy, the markers as subjective difficulties, e.g. muscular are usually evaluated. As a laboratory examination CPK or the markers of liver functions are used. It would be very useful to have a method for the determination of statin level in blood,

which would facilitate dosage and rational regulation of such a difficult and relatively expensive therapy. In Czech Republic there is not any analytical method enabling the determination of more statins in body fluids simultaneously using one simple, available, fast, sensitive and precise method nowadays. In scientific literature it is possible to find some articles dealing with the determination of statin levels in blood [1, 12, 15, 18, 22, 32]. The method, which would be able to determine clinically occurring low levels of the most widely used statins (it should be fast and accessible) was not found any way at all. This work refers about the results of the attempt to introduce such a method.

The problem was enlarged by a specific group of patients, who were in a long-term treatment. Although the diet and successful development of hypolipidemics, especially inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, enable relatively successful therapy of most patients, there is a minority of heterozygous patients with FH (less than 5%) and all homozygous patients, where the therapy is not sufficient. Nowadays, the only practical approach for the therapy of such patients is extracorporeal elimination – apheresis [7, 25]. Extracorporeal elimination of

cholesterol is a very sophisticated and successful method. Nevertheless, it is exigent for the patient as well as technically and economically.

In spite of intensive extracorporeal and other therapy patients must take maximally tolerated doses of drugs, especially statins. The results brought us to the hypothesis, that the therapeutic intervention probably could lead to the decrease of statin level and that, especially often repeated extracorporeal procedures could be inconvenient from this point of view and they could cause fluctuation of statin levels. Individually adapted adjustment of therapeutic regime would be suitable. The companies producing sorbents or filters utilized in this study state and emphasize adsorption of pathogenically active substances (lipoproteins). The decrease of LDL-cholesterol should be minimally 60 %, which is generally as approved good result of the procedure. According to the literature, extracorporeal elimination (namely LDL-apheresis) should be selective and it should not significantly influence other important plasma factors [26]. Nevertheless, the results of the research done by our group and the experience with 1500 procedures shown, that a number of other markers were influenced. For example, after LDL-procedure the total protein was decreased about 25.1% (SD 5.55 %) at our patients. Apparently, the level of drugs, which are bounded to proteins must be influenced as well even if possible dilution is subtracted (during the procedure patient get about 500 ml F1/1 and it is stated, that the measurement after the procedure could be influenced by about 10 %). Besides LDL-cholesterol the decrease of some other lipoproteins (about 2/3!) was found [10]. It is necessary to verify the real situation, since it could be practically significant.

Determination of statins in biological materials is typically performed by means of chromatographic techniques, which enable separation of analytes from the components of matrix, their subsequent identification and individual quantitation. High performance liquid chromatography (HPLC) with various types of detection (UV – ultra violet, FD – fluorescence detection and MS – mass spectrometric detection) or gas chromatography (GC) was employed.

The principal of chromatographic methods is separation of analytes in the mixture between two phases – stationary and mobile phase. The analytes dissolved in the solvent are forced through the stationary phase by the flow of mobile phase, in case of HPLC under high pressure, because stationary phase give a very high resistance, in case of GC temperature plays an important role. Mobile phase could be a liquid – liquid chromatography (LC, HPLC) or it can be a gas (GC). The separation occurs on a basis of interaction of analytes with stationary and mobile phase. If the analyte has strong affinity to the stationary phase, it is retained longer in chromatographic system, if it has low or no affinity to stationary phase it is eluted faster by mobile phase. The interactions could be based on adsorption interactions, ion-exchange interactions, affinity interactions, partition mechanism or chiral interactions.

Various chemically-physical properties are used to perform detection in chromatographic systems. Thus, the

value of refractive index, UV-VIS absorbance, fluorescence, conductivity or other electrochemical properties could be measured and expressed quantitatively as a linear response of the concentration of analyzed compounds. Recently, mass spectrometry (MS) is becoming one of the most widely employed detectors in spite of its relatively high purchasing and operational costs as well as the need for highly experienced operators. These disadvantages are compensated by very high sensitivity and selectivity especially using tandem MS techniques. Mass spectrometry utilizes the ratio m/z (m = mass, molecular weight, z = charge) for the detection. Except of the identification due to retention times (t_R) in liquid chromatography the detailed information about the structure of molecule could be acquired as a mass spectra, which is characteristic for each molecule and possibly for its fragments as well. The selectivity of the system for certain m/z is convenient in quantitative approach, where SIM (single ion monitoring) or SRM (selective reaction monitoring) modes could be employed.

The bio-analytical method for the determination of drugs in biological materials requires simplicity, high sensitivity, selectivity, small sample volume requirements and rapid turnaround time.

Patients and method

Patients

There are 12 patients with FH in the long-term treatment. Three patients are homozygous. Regular elimination procedure was performed in the patients: in homozygous FH every 10-14 days, in other hypercholesterolemic patients every 3 weeks. The mean and standard deviation of ages of all patients were 44.8 ± 16.3 years (range 19 – 61), median 51 years. The clinical phenotype of our FH patients was characterized by increased plasma levels of total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol, tendinous xanthomata, and premature symptoms of coronary heart disease. The MedPed criteria [28] using cut-points for total cholesterol and LDL cholesterol levels above the 95th percentile specific to Czech population [23] and an individual's age and family history were applied. Furthermore, DNA-based evidence of a mutation in the low density lipoprotein receptor (LDLR) gene was the criteria for homozygous FH. None of the patients had a mutation in the APOB gene.

Eight patients suffered from Fredrickson phenotype IIa hypercholesterolemia; they were either genetically proven homozygotes for an LDLR gene defect (three patients) or heterozygotes for FH. Among three patients with abnormally high cholesterol and elevated triglycerides, two were of Fredrickson IIb phenotype. One patient, who was simultaneously treated for diabetes mellitus type 2, had Fredrickson IIb-IV phenotype at the time of examination. Five patients had increased Lp(a) (> 0.30 mmol/L), with mean and standard deviation 1.20 ± 0.84 mmol/L, range 0.40-2.42 mmol/L, median 1.1 mmol/L. Mean BMI was 26.6 ± 4.56 , range 18.3 – 32.0, median 26.3. Two patients suffered from hypertension that was compensated after pharmacotherapy (blood pressure $< 140/90$ mmHg). All patients had confirmed atherosclerotic lesions as deter-

mined by the ultrasonographically measured carotid artery intima-media thickness and/or by coronarography. Diseases and conditions that are known to increase concentrations of inflammatory markers, such as acute infections and chronic inflammatory and autoimmune diseases, as well as malignancies, were excluded. All patients were treated with high-dose statins (simvastatin 40 mg or atorvastatin 40-80 mg daily), one patient in combination with fenofibrate (200 mg daily), two patients in combination with biliary acids-binding resins (6 g daily).

✦ Therapeutic procedures

LDL-apheresis: Eight patients (4 male and 4 female patients) received immunoabsorption using adsorbers with sheep antibodies against apolipoprotein B (Lipopak®, Pocard, Russia).

Hemorheopheresis: Four patients are treated by a filtration method - hemorheopheresis with Evaflux 4A filters (Kuraray, Japan). Technical details of the procedures were described earlier [5,6]. Written informed consent with the procedure was obtained from all patients. The study protocol was approved by the Institutional Ethics Committee and the reported investigations were in accordance with the principles of the current version of the Helsinki Declaration.

✦ Analytical Method

- The aim of the analytical method development was to establish fast, sensitive (up to 10^{-9} mol/l), selective and low cost method for the determination of two statins in biological materials – simvastatin and atorvastatin, which belong among the most important in the treatment of hypercholesterolemia. The method should be as well universal, in order to be able to determine both statins using the same or similar conditions, which would be very convenient for the purpose of our study. Therefore, at first conventional routine and cheap techniques including GC and HPLC with UV and FD detection respectively were tried to determine low levels of statins. As a first attempt, HPLC-UV method was tested for the determination of statins.
- Subsequently, HPLC method with fluorescence detection was applied. Statin molecule does not contain any fluorescent group naturally, thus derivatization prior to analysis was necessary. Various derivatization agents were employed: 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin, 1-bromoacetylpyren and 9-antryldiazomethan. Derivatization step is however another complicated step, which prolongs the time of analysis, complicates sample treatment and worsens method repeatability as was confirmed by our experiments.
- GC method for the determination of statins: such a method requires also derivatization prior to analysis, because statin molecules are not volatile enough in order to be analyzed by GC. In principal according to the structure of analytes, following derivatization approaches could be used: silylation, acylation and alky-

lation, thus the appropriate procedure must be chosen and optimized at first. Subsequently, the temperature, the amount of derivatization agent and the time needed for the derivatization had to be optimized.

- UPLC-MS/MS (ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry): Finally, the method for the determination of statins utilizes UPLC-MS/MS technique, in spite of its relatively higher cost. UPLC is a new trend on a field of liquid chromatographic techniques. Ultra high pressure system enables use of the advantages of small particles according to the Van Deemter theory and thus higher resolution, sensitivity and speed of analysis are obtained. Hyphenation of UPLC with MS of triple quadrupole type contributes to the high sensitivity and brings also high selectivity to the systems.

Results

1. HPLC-UV method

Unfortunately, application of HPLC-UV method gave the sensitivity 10 000 – 100 000 times lower than expected plasma levels, because statin molecules give very poor absorption in UV. Such a method, being fast and simple could be convenient for the determination of high levels, eg. in pharmaceutical formulations.

2. HPLC with fluorescence detection

Better results than with the HPLC-UV method were obtained using HPLC with fluorescence detection. The best results were obtained using 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin derivatization agent, unfortunately, only atorvastatin gave the reaction product, because the reaction was allowed only if the molecule was in the form of acid. Simvastatin, as lactone form, did not produce any reaction product. Column-switching technique had to be used so as to wash out the rest of derivatization agents.

However, the sample preparation was very time consuming and irreproducible, the consumption of derivatization agent was very high and the method sensitivity was still 10 times lower than it was required, another analytical approaches had to be tested.

3. GC approach

The results of GC approach were not very satisfactory there were several problems to consider. Diverse derivatization agents were chosen as optimal for each statin – atorvastatin was optimally derivatized using MTBSTFA (dimethyl-terc-butylsilyltrifluoroacetamide), while simvastatin provided the best results with the combination of BSTFA+TMCS (N, O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide + trimethylchlorosilane). In both cases thus the reaction mechanism was silylation. The problems were as follows: First, the reaction was not selective enough, thus in the case of both statins two peaks were observed in the chromatogram, which indicated the probability of the presence of more reactive sites in statin molecule. Such phenomenon could complicate the quantitation of compounds. Second, the analysis time (about 25

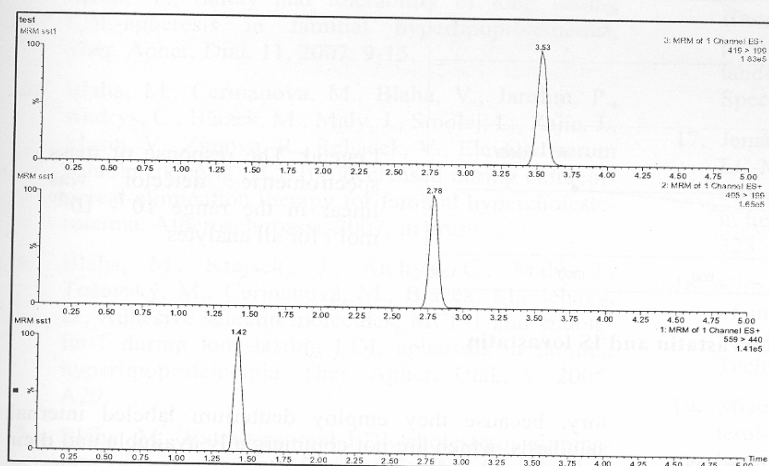
minutes) and the time needed for the derivatization (60 minutes for simvastatin and 30 minutes for atorvastatin respectively) are practically unacceptable. Third, the sensitivity of the detection using FID (flame ionization detector) was still 100 times lower than it was necessary for the sensitive determination of statins in biological materials.

4. UPLC-MS/MS

UPLC-MS/MS was the only method, which gave sufficient sensitivity and reproducibility together with high selectivity within the reasonable time period with no need of any complicated derivatization. Using highly selective modes – SIM (single ion monitoring) and SRM (selective

reaction monitoring) is very convenient for quantitation of substances in complicated matrices.

Only specific molecule ion - $[M+H]^+$ in case of both statins was monitored in SIM – (Table 1) mode using ESI (electrospray ionization) in positive, thus for atorvastatin (MW = 558.25) the mass 559.2 = $[M+H]^+$ and for simvastatin (MW = 418.2) the mass 419.2 = $[M+H]^+$. Only specific transition in SRM mode that means $[M+H]^+ \rightarrow$ fragment of molecular ion was monitored for both statins, in case of simvastatin 419.2 \rightarrow 199.2 and 559.2 \rightarrow 440.2 for atorvastatin (Table 2, Fig. 1). Internal standard lovastatin was used to get reliable results as well when sample preparation step will be introduced.



Legend: Retention times [min] are as follows: atorvastatin (1.42), lovastatin (2.78) and simvastatin (3.52).

Figure 1 SRM chromatogram of separation of atorvastatin, lovastatin and simvastatin in ESI⁺

So far, the repeatability of results in standard experiments was excellent. The results for RSD values obtained in SIM mode were 12.97 % for atorvastatin and 0.98 % for simvastatin (Table 1).

Table 1 Results in SIM

	Atorvastatin	Lovastatin	Simvastatin
$[M+H]^+$	559.2	405.2	419.2
t_r	1.42	2.78	3.52
cone V	35	30	30
dwel time	0.20	0.20	0.20
repeatability - t_r	0.39 %	0.16 %	0.11 %
repeatability A	12.97 %	3.79 %	0.98 %
Sensitivity	10^{-9} mol/l	10^{-8} mol/l	10^{-9} mol/l

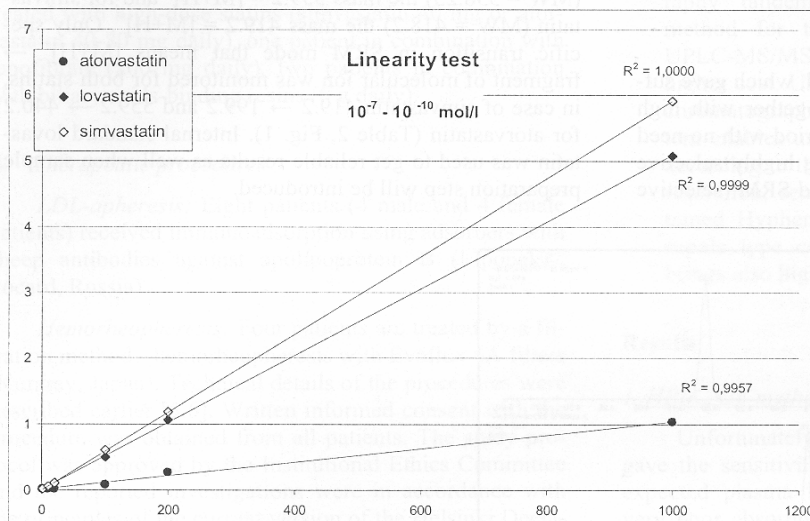
Legend: $[M+H]^+$ = molecular ion in positive ESI mode; t_r = retention time, A = peak area

Table 2 Results in SRM

	Atorvastatin	Lovastatin	Simvastatin
SRM transition	559.2 > 440.2	405.2 > 199.2	419.2 > 199.2
t_r	1.42	2.78	3.52
cone V	35	20	20
dwel time	0.20	0.20	0.20
repeatability - t_r	0.00 %	0.00 %	0.00 %
repeatability A	6.82 %	1.14 %	1.40 %
Sensitivity	10^{-10} mol/l	10^{-10} mol/l	10^{-10} mol/l

Legend: t_r = retention time, A = peak area

The lowest levels reached by this method were up to 10^{-9} mol/l. In SIR mode the repeatability for atorvastatin was 6.82 % and 1.40 % for simvastatin, the lowest levels reached were even 10^{-10} mol/l (Table 2). Thus, SIR mode was finally chosen for the quantitation because of better sensitivity, repeatability and as well selectivity (the transition is more specific than the mass). Calibration curves were linear in the range from 10^{-7} - 10^{-10} mol/l, which means very wide dynamic linear range of the method (Fig. 2).



Legend: The response of mass spectrometric detector was linear in the range 10^{-7} - 10^{-10} mol/l for all analytes.

Figure 2 Calibration curves of simvastatin, atorvastatin and IS lovastatin

5. Clinical results

Concerning clinical results, which are not the main goal of the communication – the therapy is successful. The treatment of patients with severe form FH was started 11 years ago. The results of the measurements after 5 years (300 procedures using specific immunoadsorption LDL-apheresis) showed the average decrease of LDL-cholesterol about 82.7 %, total cholesterol about 67.0 %, triacylglycerides about 51.7 %, Apo B about 73.2 % and Lp(a) about 67.6 %. This led to the stoppage of progression of atheromatose at 7 from 9 long-term treated homozygous patients. ⁽⁸⁾ Adverse effects of the therapy were not common (5.3 %) and they were not significant. ⁽⁴⁾

Discussion

In spite of relatively high number of methods already published for the determination of both statins – simvastatin [3,17,19,22,27,29 -31, 33, 34] and atorvastatin [2,9,11,13, 16,20,21] it is difficult to choose the one, which would be convenient for our purposes. A lot of methods suffer from insufficient sensitivity for desired bio-analytical application [2,9,11,16,17, 20 -22,27,30], which are almost all methods for atorvastatin. None of the stated methods determines atorvastatin and simvastatin together in biological matrices except of [19], which is an application for determination of statins in aqueous samples. Two methods, which have sufficient sensitivity for the determination use sodium adduct $[M+Na]^+$ for quantitation [3,31] which is not recommended in correct MS approaches. Some methods, even if they have unique sensitivity [29,33,34] are also unavailable for our labora-

tory, because they employ deuterium labeled internal standards, which are not commercially available and their synthesis would be un-respectably expensive. None of already published methods tried to employ UPLC, as it is relatively new trend on a field of separation techniques. Its application is promising, especially from the sensitivity point of view.

Additional investigation on a field of pharmacokinetics of statins, which involves precise determination of statin levels before and after extracorporeal procedure is necessary. Clinically useful method should be available, reproducible, relatively cheap, fast and very precise. The proposed UPLC-MS/MS method corresponds to the requirements. After the verification on clinical samples it would be applicable in order to control statin levels during conventional standard therapy as well as in the case of stain level alterations during extracorporeal elimination. The intention is also to verify whether the sorbents or filters adsorb statin molecules, eventually in what quantity. According to the results it will be possible to suggest the changes in therapeutic protocol concerning either the doses or timing. Above stated refinement of exigent therapy should bring its greater rationality, its higher effectiveness and probably the economical impacts as well. Using a precise timing savings are supposed.

Literature

- Altuntas, T. G., Erk, N., Liquid chromatographic determination of atorvastatin in bulk drug, tablets, and human plasma. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 27, 2004: 83 - 93.

2. Bahrami G, Mohammadi B, Mirzaeei A, Kiani A, Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 826, 2005: 41-45.
3. Barrett B, Huclová J, Bořek-Dohnalský V, Němec B, Jelínek I, Validated HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of simvastatin and simvastatin hydroxy acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 2006: 517 - 526.
4. Bláha, M., Cermanová, M., Bláha, V., Blažek, M., Malý, J., Široký, O., Solichová, D., Filip, S., Řeháček, V., Safety and tolerability of long lasting LDL-apheresis in familial hyperlipoproteinemia, *Ther. Apher. Dial.* 11, 2007: 9-15.
5. Blaha, M., Cermanova, M., Blaha, V., Jarolim, P., Andrys, C., Blazek, M., Maly, J., Smolej, L., Zajic, J., Masin, V., Zimova, R., Rehacek, V.: Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 2007, in press.
6. Bláha, M., Krejsek, J., Andrýs, C., Malý, J., Tošovský, M., Cermanová, M., Blažek, M., Jebavý, L., Adhesive selectin molecules, MCP-1 and endotelin-1 during long-lasting LDL apheresis in familial hyperlipoproteinemia. *Ther. Apher. Dial.*, 9, 2005: A29.
7. Bláha, M., Extracorporeal LDL-cholesterol elimination in the treatment of severe familial hypercholesterolemia. *Acta Medica (Hradec Králové)* 46, 2003: 3 - 7.
8. Bláha, V., Solichová, D., Zadák, Z., Bláha, M., Havel, E., Vyroubal, P., Malý, J., Imunoadsorption LDL-apheresis in the treatment of hypercholesterolemia: five years of research and clinical experience. *Nutrition* 18, 2002: 211.
9. Bullen WW, Miller RA, Hayes RN, Development and validation of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for atorvastatin, ortho-hydroxy atorvastatin, and para-hydroxy atorvastatin in human, dog and rat plasma. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 10, 1999: 55-66.
10. Cermanová, M., Bláha, M., Bláha, V., Havel, E., Vyroubal, P., Zadák, Z., Blažek, M., Malý, J., Mašín, V., LDL-aféřza – hodnocení výsledků 1000 provedených procedur. *Transfúze a hematologie dnes.* 11, 2005: 116-121.
11. Erturk S, Aktas E.S, Ersoy L, Ficicioglu S, An HPLC method for the determination of atorvastatin and its impurities in bulk drug and tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33, 2003: 1017-1023.
12. Haginaka, J.: Drug determination in serum by liquid chromatography with restricted access stationary phases. *Trends. Anal. Chem.*, 10, 1991: 17-22.
13. Hermann M, Christensen H, Reubsæet JLE, Determination of atorvastatin and metabolites in human plasma with solid-phase extraction followed by LC-tandem MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 2005: 1242-1249.
14. Hyánek, J., Martiníková, V., Dubská, L., Dvořáková, J., Pehal, F., Pejzonochová, H., Naše první zkušenosti s léčbou dětských familiárních hypercholesterolémii ezetimibem. *Ateroskleróza.* 10, 2006: 101-107.
15. Iacona, I., Regazzi, M. B., Buggia, I., et. al.. High performance liquid chromatography determination of pravastatin in plasma. *Therap. Drug Monitoring.* 16, 1994: 191 - 195.
16. Jemal M, Ouyang Z, Chen BCh, Teitz D, Quantitation of the Acid and Lactone Forms of Atorvastatin and its Biotransformation products in human serum by high-performance liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 13, 1999: 1003-1015.
17. Jemal M, Ouyang Z, Powell M.L, Direct-injection LC-MS-MS method for high-throughput simultaneous quantitation of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23, 2000: 323 - 340.
18. Kim, B. C., Ban, E, Park, J. S., et. al., Determination of simvastatin in human plasma by column-switching HPLC with UV detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 27, 2004: 3089 - 3102.
19. Miao XS, Metcalfe ChD, Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 998, 2003: 133 - 141.
20. Mohammadi A, Rezanour N, Dogaheg MA, Bidkorbeh FG, Hashem M, Walker RB, A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *J. Chromatogr. B* 846, 2007: 215-221.
21. Nigori RVS, Kandikere VN, Shukla M, Mudigonda K, Maurya S, Boosi R, Anjaneyulu Y, Simultaneous quantification of atorvastatin and active metabolites in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using rosuvastatin as internal standard. *Biomed. Chromatogr.* 20, 2006: 924-936.
22. Ochiai H, Uchiyama N, Imagaki K, Hata S, Kamei T, Determination of simvastatin and its active metabolite in human plasma by column-switching high-performance liquid chromatography with fluorescence detection after derivatization with 1-bromoacetylpyrene. *J. Chromatogr. B* 694, 1997: 211-217.
23. Šamánek M, Urbanová Z., Cholesterol and triglyceride levels and their development. *Čas. Lék. Čes.* 136, 1997: 380-5.
24. Spáčil, J., Pokles mortality se v posledních letech zastavil. *Čas. Lék. Čes.*, 145, 2006: 285-287.

25. Thompsen, J., Thompson, P.D., A systematic review of LDL-apheresis in the treatment of cardiovascular diseases. *Atherosclerosis*, 189, 2006: 31-38.
26. Thompson, G., R., LDL apheresis. *Atherosclerosis*, 167, 2003: 221 - 225.
27. Wang H, Wu Y, Zhao Z, Fragmentation study of simvastatin and lovastatin using electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36, 2001: 58-70.
28. Williams, R.R., Hunt, S.C., Schumacher, M.C., Hegele, R.A., Leppert, M.F., Ludwig, E.H., Hopkána, P.N., Diagnosing heterozygous familial hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *Am. J. Cardiol.* 72, 1993: 171-6.
29. Yang AY, Sun L, Musson DG, Zhao JJ, Application of a novel ultra-low elution volume 96-well solid-phase extraction method to the LC/MS/MS determination of simvastatin and simvastatin acid in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38, 2005: 521-527.
30. Yang DJ, Hwang LS, Study on the interconversion of three natural statins from lactone forms to their corresponding hydroxyl acid forms and their determination in Pu-Ehr tea. *J. Chromatogr. A* 1119, 2006: 277-284.
31. Yang H, Feng Y, Luan Y, Determination of simvastatin in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 785, 2003: 369 - 375.
32. Ye, L.Y., Firby, P.S., Moore, M.J., Determination of lovastatin in human plasma using reverse-phase high-performance liquid chromatography with UV detection. *Therap. Drug Monitoring* 22, 2000: 737-741.
33. Zao JJ, Yang AY, Rogers JD, Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion-spray tandem mass spectrometric determination, *J. Mass Spectrom.* 37, 2002: 421-433.
34. Zhao JJ, Xie IH, Yang AY, Roadcap BA, Rogers JD, Quantitation of simvastatin and its b-hydroxy acid in human plasma by liquid-liquid cartridge extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 35, 2000: 1133-1143.

Acknowledgments

The work was supported by the grant IGA MH CZ NR/9103-4 and no. 1A/8689-4.

PharmDr. Lucie Nováková, PhD.

Katedra analytické chemie

Farmaceutická fakulta UK

Heyrovského 1203

500 05 Hradec Králové

E-mail: nol@email.cz

Příloha IV

Lucie Nováková, Hana Vlčková, Dalibor Šatínský, Petr Sadílek, Dagmar Solichová, Milan Bláha, Vladimír Bláha a Petr Solich:

Ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin, Journal of Chromatography B 877 (2009) 2093-2103



Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometric detection in clinical analysis of simvastatin and atorvastatin

Lucie Nováková^{a,*}, Hana Vlčková^a, Dalibor Šatínský^a, Petr Sadílek^a, Dagmar Solichová^b, Milan Bláha^c, Vladimír Bláha^c, Petr Solich^a

^a Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^b Department of Metabolic Care and Gerontology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

^c Department of Haematology, Charles University, Faculty of Medicine and University Hospital in Hradec Králové, Sokolská 581, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2009

Accepted 26 May 2009

Available online 17 June 2009

Keywords:

Atorvastatin

Simvastatin

Hemodialysis

UPLC

Tandem mass spectrometry

Bio-analytical method

ABSTRACT

Simvastatin and atorvastatin belong to the group of hypolipidemic drugs, more exactly to the second generation of inhibitors of microsomal 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase. They induce a significant reduction in total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and plasma triglycerides, therefore they are widely used in the treatment of hypercholesterolemia even of its severe form-familial hypercholesterolemia. Simvastatin and atorvastatin as the most widely used statins in clinical treatment and their hydroxy-acid/lactone forms were determined by means of UPLC in connection with triple quadrupole mass spectrometer. Deuterium labeled reference standard compounds were used as internal standards for the quantitation. Separation was performed on Acquity BEH C18 (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm) using gradient elution by mobile phase containing acetonitrile and ammonium acetate pH 4.0, which is convenient in order to prevent interconversion of analytes. ESI in positive mode was used for the ionization of all compounds. Two SRM (selected reaction monitoring) transitions were carefully optimized for each analyte in order to get high sensitivity and selectivity. SPE on Discovery DSC-18 was used as a sample preparation step. Intra-day precision was generally within 10% RSD, while inter-day precision within 15% RSD. Method accuracy expressed as recovery ranged from 75 to 100%. The method was validated with the sensitivity reaching LOQ 0.08–5.46 nmol/l and LOD 0.01–1.80 nmol/l in biological samples. Atorvastatin, simvastatin, its metabolites and hydroxy-acid/lactone forms were monitored in human serum and in lipoprotein fractions (LDL, HDL and VLDL) at patients with end stage renal diseases.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Statins are drugs widely used for the treatment of severe forms of hypercholesterolemia, such as familial hypercholesterolemia. They have potent cholesterol-lowering effect and they could significantly reduce morbidity and mortality associated with coronary heart disease as it was proven by many clinical trials [1–4]. They possess high effectiveness in reducing total cholesterol and low-density lipoprotein (LDL) cholesterol levels in human body. HMG-CoA reductase is the key enzyme that catalyzes the conversion of HMG-CoA to mevalonate, which is an early rate-limiting step in the cholesterol biosynthetic pathway. Statins are effective HMG-CoA inhibitors, however some of statins exhibit a number of adverse effects, such as myopathy or rhabdomyolysis [1]. Therapeutic range of statins is

typically 10–80 mg/day. Maximum plasma concentration (c_{max}) has been reported to be 27–66 ng/ml for atorvastatin and 10–34 ng/ml for simvastatin [5,6]. High doses could be used with caution in the elderly, in patients with renal or hepatic insufficiency, hypothyroidism or diabetes. Therapeutic drug monitoring is not routinely done in patients treated by statins. They are only advised to report to their doctors if muscle aches, pains or weakness develop. Therefore it would be highly convenient and helpful to monitor the levels of statins in biological materials in order to establish and control appropriate dosage scheme, which would minimize adverse effects and keep the cholesterol lowering effect. Moreover, the method is useful when some extracorporeal elimination procedure (e.g. hemodialysis) is used in order to determine if losses of statins do not occur during the procedure.

Patients with chronic renal disease often suffer from a secondary form of complex dyslipidaemia [7]. The most important abnormalities in the lipid profile are an increase in triglyceride levels, the presence of small, dense LDL particles and low high-density

* Corresponding author. Tel.: +420 495067345; fax: +420 495067164.
E-mail address: nol@emal.cz (L. Nováková).

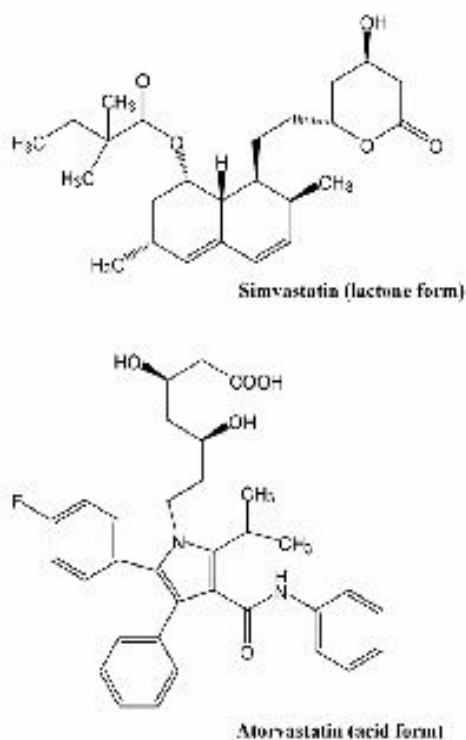


Fig. 1. Chemical structures of simvastatin and atorvastatin.

lipoprotein (HDL) cholesterol levels. The increase in triglyceride levels is due to elevated levels of very-low-density lipoprotein (VLDL) remnants and intermediate-density lipoprotein (IDL). Each of these parameters has been associated with increased risk of cardiovascular disease [7].

Atorvastatin and simvastatin are two drugs worldwide the most commonly occurred in commercially available pharmaceutical formulations used in the clinical treatment of hypercholesterolemia. Structures could be seen in Fig. 1. Because of the complex and difficult-to-treat dyslipidaemia in dialysis patients, higher doses of statin might be of value in the treatment of hypercholesterolaemic patients on hemodialysis. Hemodialysis is not expected to enhance significantly the clearance of statin, since the drug is extensively bound to plasma proteins (atorvastatin 80–90%, simvastatin 94–98%). However, it is known that renal dysfunction may hamper the hepatic metabolism of drugs [8,9], which could lead to accumulation of statin and/or its long-lived metabolites, in turn increasing the risk of clinically important adverse events such as rhabdomyolysis. Moreover, as both atorvastatin and simvastatin are lipophilic agents, it can be assumed that not only the changes in liver lipoprotein metabolism, but also the distribution of statin in already abnormally modified lipoprotein fractions can be clinically important. This warrants the performance of supplemental studies on the plasma statin levels and its distribution in lipoprotein fractions, and this is the reason why the study of the presence of atorvastatin in different lipoprotein fractions would be of high significance.

Statin molecules exist in two forms, lactone and open-ring hydroxy acid form [10,11]. In vivo, the hydroxy acid forms are the active drugs to lower plasma cholesterol while the lactone forms are inactive (prodrug). Lactone form of statin can be absorbed from the gastrointestinal tract and transformed to the active drugs in liver and non-hepatic tissues [11]. Simvastatin is a prodrug, which is administered as an inactive lactone form. The lactone is absorbed

from gastrointestinal tract and hydrolyzed to the active β -hydroxy acid form in the liver [12,13].

Atorvastatin is administered in the open-ring hydroxy acid form—the active form. It is absorbed from the gastrointestinal tract and it undergoes extensive first-pass metabolism in the liver. Liver metabolism produces two active hydroxy metabolites being ortho-hydroxyatorvastatin and para-hydroxyatorvastatin and three inactive corresponding lactone forms. More than 90% is bound to plasma proteins. About 70% of the total plasma HMG-CoA activity is attributed to active metabolites of atorvastatin, even if their concentrations are very low [12–14]. As it figures out from the information above, the levels of statins in biological fluids are very low, probably because only about 5% of dosed statin reaches the systemic circulation. Typical plasma concentrations are in ng/ml levels. The active metabolites of atorvastatin are present at plasma concentration corresponding to pg/ml levels [13], typical concentration range being between 0.1 and 20 ng/ml.

Statins are a typical example of drugs, where the interconversion between lactone and open-ring hydroxy acid occurs [10,11]. When the development of a method for the quantitation of two analytes that can undergo interconversion is performed—the first step is to select the conditions that will eliminate or minimize the interconversion. The second step is to judiciously select the composition of the QC samples and the composition of calibration standards, which should cover the spectrum of the composition of real samples. For the samples of hydroxy acid chemical structure and the corresponding lactone forms it is important to maintain pH between 4 and 5 in order to minimize interconversion. Increasing the pH above 6 facilitates the conversion of the lactone to the acid (in the ionized form), contrariwise, lowering pH facilitates the conversion of the acid to lactone form or the lactone to the acid (in the non-ionized form). The most of assays utilizes pH around 4.5 [10–15].

As it figures out from the different structures of simvastatin and atorvastatin, analytical methods for their quantitative determination were developed individually. Because of the structure properties, there are not many analytical methods which determine these two compounds together in one analytical run or even in combination with other statin molecules. This is also probably due to the fact, that statins are not used with other statins simultaneously during the treatment of hyperlipidemic patients. The methods for the determination of simvastatin and atorvastatin were recently reviewed by our group [15]. In clinical applications HPLC-MS/MS was unequivocally the method of choice in analysis of both simvastatin [16–21] and atorvastatin together with its metabolites [22–25] using typically ESI (electrospray ionization) in positive ion mode.

The aim of this work was to develop fast, reliable, sensitive and selective analytical method for the determination of simvastatin and atorvastatin together with metabolites and lactone/hydroxy-acid interconversion forms using UPLC-MS/MS method. In spite of the fact, that statins are not used simultaneously during the treatment of hypercholesterolemia, such a procedure is useful in daily routine sample handling, when many samples from patients taking either atorvastatin or simvastatin are analyzed in one laboratory. Thus the laboratory does not need to distinguish among samples to be analyzed, to perform two different procedures for individual statins, which increases the sample throughput of the laboratory.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Working standards of simvastatin were obtained from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). Working standards of simvastatin acid, atorvastatin lactone and atorvastatin, *p*-hydroxyatorvastatin, *o*-hydroxyatorvastatin, simvastatin deuterium labeled (D₆-methyl

Table 1
Optimization of specific transitions for all analytes.

	Compound	Precursor	Precursor type	Fragment	Dwell time	Cone voltage	Collision energy	t_R
1	p-Hydroxyatorvastatin	575.0	[M+H] ⁺	440.1	0.05	30	20.0	2.49
				466.2		30	15.0	
1	o-Hydroxyatorvastatin	575.0	[M+H] ⁺	440.1	0.05	30	20.0	2.89
				466.2		30	15.0	
2	Atorvastatin	559.0	[M+H] ⁺	440.1	0.05	30	20.0	2.89
				466.1		30	15.0	
3	Atorvastatin-deuterium labeled	564.0	[M+H] ⁺	445.1	0.05	30	20.0	2.89
				471.0		30	15.0	
4	Atorvastatin lactone	541.0	[M+H] ⁺	448.0	0.05	30	15.0	3.19
				422.1		30	20.0	
5	Simvastatin acid	437.0	[M+H] ⁺	303.00	0.05	15	10.0	3.48
				285.3		15	15.0	
6	Simvastatin	419.0	[M+H] ⁺	199.2	0.05	20	10.0	4.39
				285.3		20	10.0	
7	Simvastatin-deuterium labeled	425.1	[M+H] ⁺	199.2	0.05	20	10.0	4.40
				285.3		20	10.0	

groups) and atorvastatin deuterium labeled (D5-phenyl ring) were purchased from Toronto Research Chemicals (Ontario, Canada).

The acetic acid, reagent grade, the ammonium, reagent grade, the formic acid, reagent grade and the acetonitrile, LC-MS grade, were purchased from Sigma-Aldrich. HPLC grade water was prepared by Milli-Q reverse osmosis Millipore (Bedford, MA, USA) and it meets European Pharmacopoeia requirements.

2.2. Chromatography

UPLC System Acquity (Waters, Prague, Czech Republic) was used for the purposes of this study. It consists of ACQ-binary solvent manager, ACQ-sample manager and ACQ-tunable UV detector. All UPLC analyses were performed on BEH C₁₈ analytical column (100 mm × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters, Prague, Czech Republic) based on Bridged Ethyl Hybrid (BEH) particles. Mobile phase was composed of acetonitrile and 0.5 mM ammonium acetate buffer pH 4.0 using gradient elution, initial mobile phase composition being acetonitrile, ammonium acetate buffer (30:70). Thereafter the concentration was changed within 1.5 min to 30% of ammonium acetate buffer and subsequently to 5% of the buffer within 5.25 min. Flow rate was 0.25 ml/min. The analytical column was kept at 35 °C by column oven. The solutions were stored in the autosampler at 4 °C. The full loop injection mode was set up to inject 5 μl using 5 μl injection loop. Acetonitrile was used as a strong wash and 20% acetonitrile in water was used as a weak wash solvent.

2.3. Mass spectrometry

The MS/MS triple quadrupole system was used for the purposes of this study. Quattro Micro (Micromass, Manchester, GB) was equipped with a Multi-Mode Ionization Source (ESI), which combines high-speed switching between electrospray ionization (ESI) and Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) within one ion source.

Ion source set-up was carefully tuned as follows: capillary voltage: 3500 V, ion source temperature: 130 °C, extractor: 3.0 V, RF lens: 1.0 V. The desolvation gas was nitrogen at flow 500 l/h and at the temperature 375 °C. Cone voltage was set up individually for each analyte (Table 1). Nitrogen was used also as a cone gas (120 l/h) to prevent the contamination of sample cone. Quantitation of all analytes was performed in ESI positive ion mode using

SRM (selected reaction monitoring) experiment. Two specific transitions were optimized for each molecule to increase selectivity of the method. Argon was used as collision gas and collision energy was optimized for each analyte individually (Table 1).

The MassLynx 4.1 Data System was used for data MS control and data gathering. QuanLynx software was used for data processing and quantitation—regression analysis of standard curves and calculation of concentrations.

2.4. Preparation of standard solutions

The stock solutions of standards were prepared by dissolving of the amount corresponding to 1.0 mmol/l concentration of appropriate working standard into 1.0 ml of solution media according to the solubility properties, because the molecules differ significantly in solubility. The stock solutions of simvastatin, simvastatin D6 and atorvastatin lactone were prepared in pure acetonitrile. The stock solutions of atorvastatin, atorvastatin D5, atorvastatin hydroxy-metabolites and simvastatin acid were prepared in mobile phase used at initial step of gradient elution—acetonitrile, ammonium acetate buffer 0.5 mM, pH 4.0 (30:70).

Stock solutions were further diluted by mobile phase (from stability reason to keep pH of solution between 4.0 and 5.0 to prevent interconversion) to achieve a concentration 10 nmol/l for SST (System suitability test) measurements, and to get individual points of calibration curve in the range 0.1–100 nmol/l, using seven calibration points (100, 50, 10, 5.0, 1.0, 0.5 and 0.1 nmol/l).

2.5. Sample preparation

Serum and lipoprotein fraction samples were prepared using SPE (solid phase extraction) procedure. These following sorbents were tested: ZORBAX SPE C-18 (100 mg, 1 ml) (Agilent Technologies), Oasis HLB (hydrophilic-lipophilic balance) SPE (60 mg, 3 ml) (Waters), and Discovery DSC-18 (100 mg, 1 ml) (Supelco). SPE columns Discovery DSC-18 were chosen as optimal for final validation of the method.

LS (100 μl) was added to 900 μl of the serum samples containing the analytes. This sample was diluted with 1 ml of ammonium acetate buffer and mixed. The mixture was loaded on Discovery DSC-18 sorbent previously activated with 1 ml of acetonitrile and conditioned with 1 ml of 0.1 M ammonium acetate buffer pH 4.5.

The SPE cartridge with loaded sample was washed with 1 ml of mixture acetonitrile:0.01 M ammonium acetate buffer pH 4.5 (15:85, v/v), and subsequently the analytes were eluted with 1 ml of acetonitrile:0.1 M ammonium acetate buffer pH 4.5 (95:5, v/v). The eluate was filtered via 0.20 µm PTFE filter and sample was injected onto HPLC system.

2.6. System suitability test and validation

An important part of method validation is the SST, details of which are usually given in Pharmacopoeias [26,27]. The SST was performed under optimized chromatographic conditions. In mass spectrometric methods only repeatability of retention times and peak area is checked.

Calibration curves of all analytes in the concentration range 0.1–100 nmol/l were measured. Method precision and accuracy were established. For the precision, spiked blank serum at three different concentration levels were measured in three replicates to calculate RSD, which describes the closeness of agreement between series of measurements. Accuracy was determined as a method recovery using spiked blank serum, again at three different levels in three replicates to establish the closeness of agreement between the true and measured value as it corresponds to ICH (International Conference on Harmonization) requirements [28]. QC samples were prepared at the same concentrations as were the concentration levels prepared for precision and accuracy experiments. Lyophilized standard serum samples were used for the purposes of method validation.

Selectivity and matrix effects were also verified. For the determination of selectivity the injection of blank serum treated by the same sample preparation step was used. Matrix effects were established using direct inlet by Hamilton syringe, where standard mix solution was introduced to the mass spectrometer by direct infusion and the blank serum was injected by the autosampler to observe matrix suppressions or enhancements as positive or negative peaks influencing data plot of analytes.

Limit of detection and quantitation was established based on signal-to-noise (S/N) ratio approach. Limit of detection was expressed as S/N = 3, limit of quantitation was expressed as S/N = 10.

2.7. Patients

Plasma levels of statins have been already analyzed in healthy individuals [5]. However the presence of disease or concomitant therapy are important variables modifying the plasma statin levels [6,29]. Because the aim of this work was to study potential benefit from lipid-lowering treatment by statins in a group of high-risk patients on chronic hemodialysis, and because data on statin levels in hemodialysis patients are incomplete, following patients were randomly selected.

Ten end stage renal disease (ESRD) patients (8 females, 2 males, median age 68 years (range 55–83 years)) on chronic hemodialysis (median duration 30 months, range 4–63 months) were randomly selected. All the patients were recruited at the hemodialysis center in Hradec Králové, Czech Republic. Hemodialysis was performed for three times a week, using bicarbonate buffer and polysulfone dialysis membranes. Dialysis adequacy was estimated by Kt/V according to Daugirdas formula [30]. All patients were on a stable anticoagulation regimen using heparin. None of the patients showed clinical evidence of any acute disease, had malignancies, took corticosteroids, or immunosuppressive therapy at the beginning of the study. All of the patients were informed and Local Ethics Committee of our hospital approved the study.

The following concomitant drugs were not permitted during this study: (i) other lipid-lowering drugs or preparations (acipimox, niacin, fibrates, bile sequestrants, other statins, soluble fibre preparations like psyllium and Metamucil); (ii) other drugs known to modulate lipid parameters (corticosteroids, isotretinoin); (iii) antioxidant vitamins; (iv) immunosuppressive drugs; (v) drugs known to be associated with myopathy in combination with HMG-CoA reductase inhibitors, due to competition for metabolic pathways (cyclosporin, macrolide antibiotics, azole antifungals). Permitted medications, e.g. antihypertensive drugs and phosphate-binding drugs, were to be kept constant throughout the study, both in dosage and time of intake. The occasional use of antacids was permitted. Any concurrent medications were to be taken at least 30 min after the study medication. Patients were asked not to change their eating habits during the course of the study.

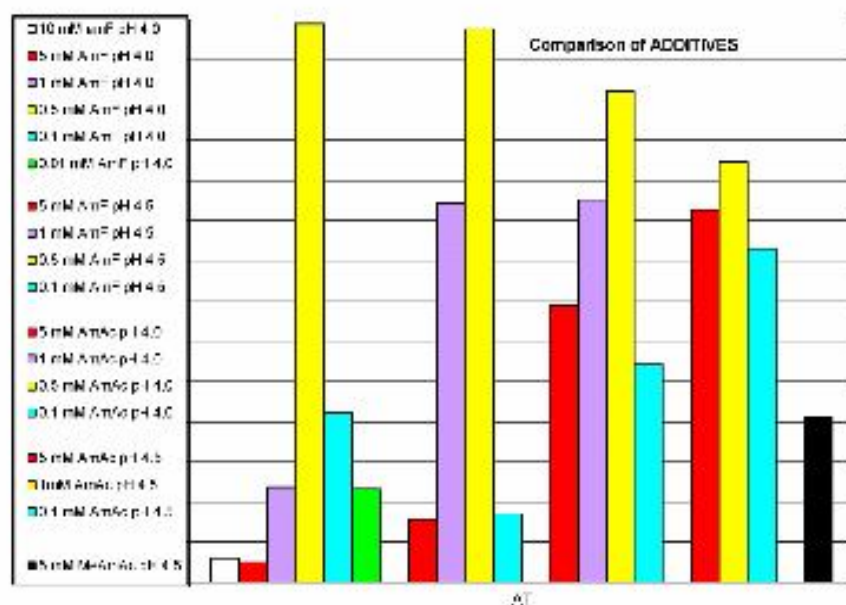


Fig. 2. Optimization of mobile phase additives—the influence of ammonium formate and ammonium acetate at various pH and concentrations.

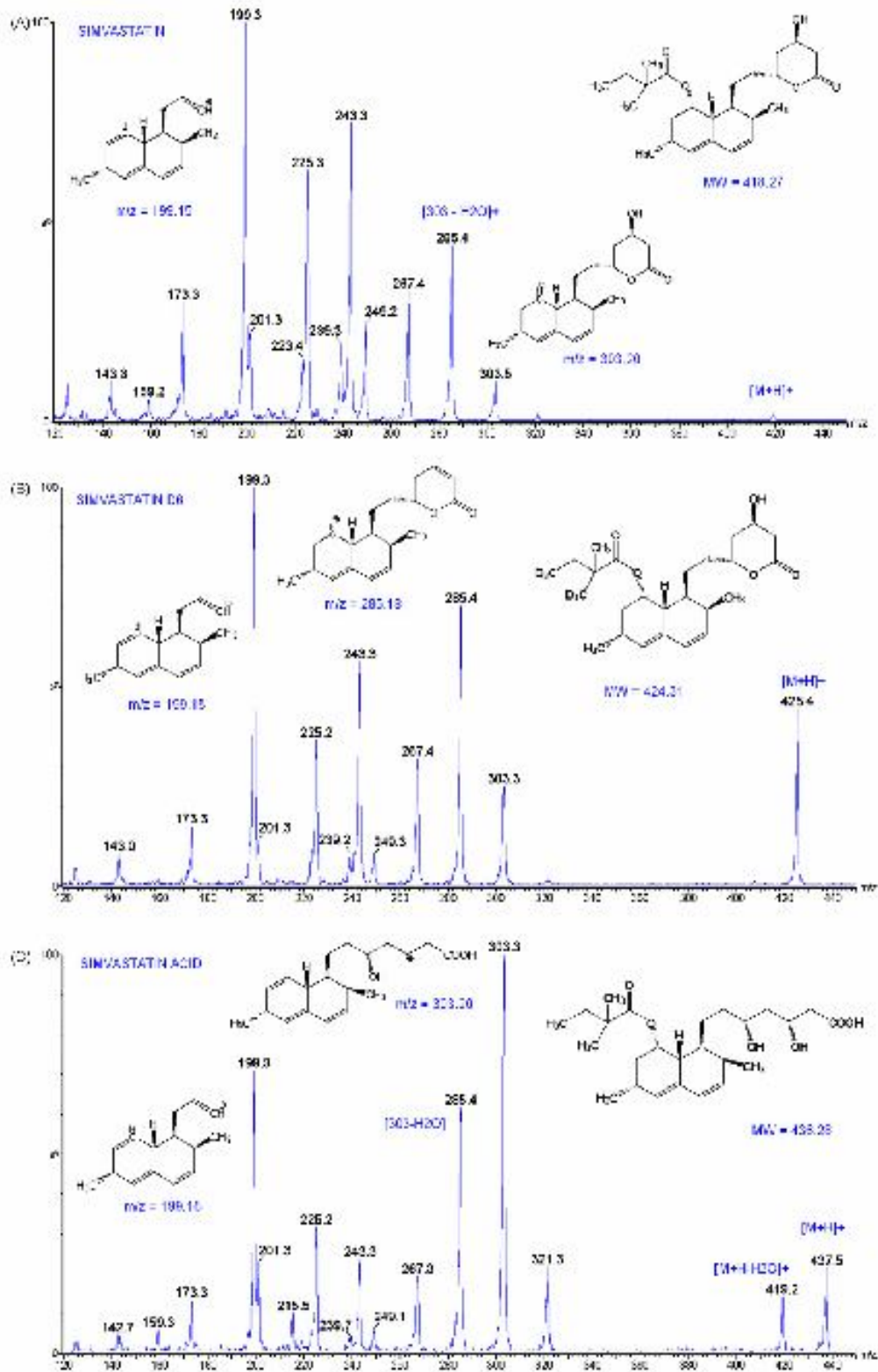


Fig. 3. Product ion spectra of simvastatin (A), simvastatin D6 (B) and simvastatin acid (C).

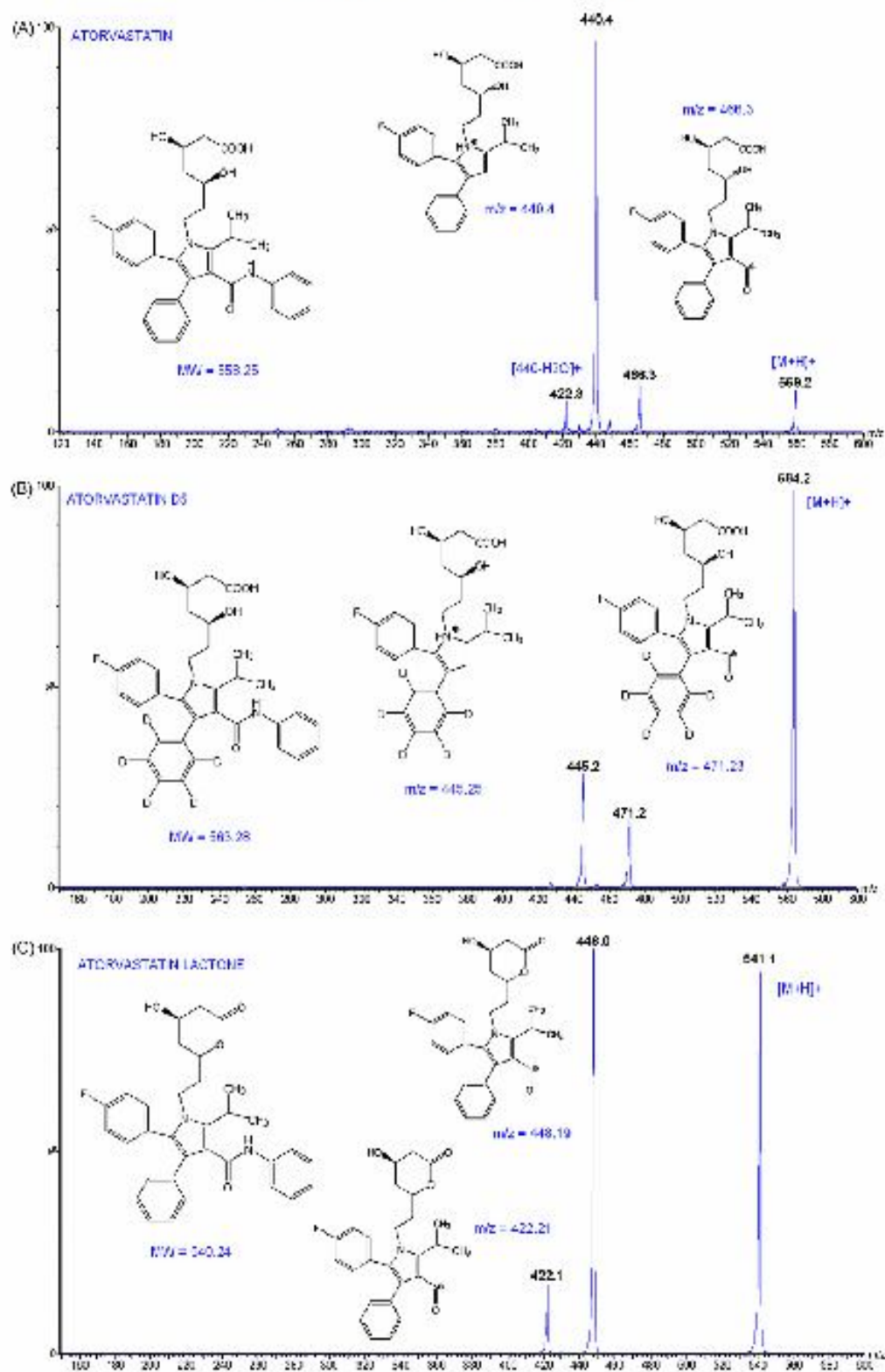


Fig. 4. Product ion spectra of atorvastatin (A), atorvastatin D5 (B) and atorvastatin lactone (C).

2.7.1. Protocol of drug administration and blood sampling

Participants were treated by 40 mg of atorvastatin or 20 mg of simvastatin daily. Drug intake had to be performed at 9.00 p.m. and started at least 4 weeks prior the study.

2.8. Biochemical analyses

For the evaluation of statin levels and its metabolites, two blood samples were taken: one just before the start of the dialysis session, the second just after dialysis. Blood samples were collected at the beginning of the study. The blood was drawn from needle inserted in vascular access for dialysis in fasting state before the start of hemodialysis at 7.00 a.m., and the second blood sample was drawn just after dialysis i.e. after 4 h of hemodialysis. After separation, serum aliquots were stored at -80°C until analysis. The samples were assayed in random order. All samples were analyzed by personnel who had no knowledge of the subjects' clinical data.

Serum lipoprotein fractions were prepared using NaCl density gradient ultracentrifugation (Beckman TL 100, Palo Alto, USA). The lipoprotein fractions were distinguished in the following density ranges: VLDL < 1.006 g/ml; LDL < 1.063 g/ml; HDL > 1.063 g/ml

3. Results and discussion

3.1. Ultra performance liquid chromatography and mass spectrometry

UPLC was used as separation method for the analysis of statins, their interconversion products and metabolites. In early experiments isocratic elution was applied. Minimally 70% of acetonitrile were necessary to elute statins in reasonable retention times. The separation was developed with the regard to the stability of analytes and mass spectrometric detection, which is quite limited in terms of solvents that could be used. Only few additives could enable

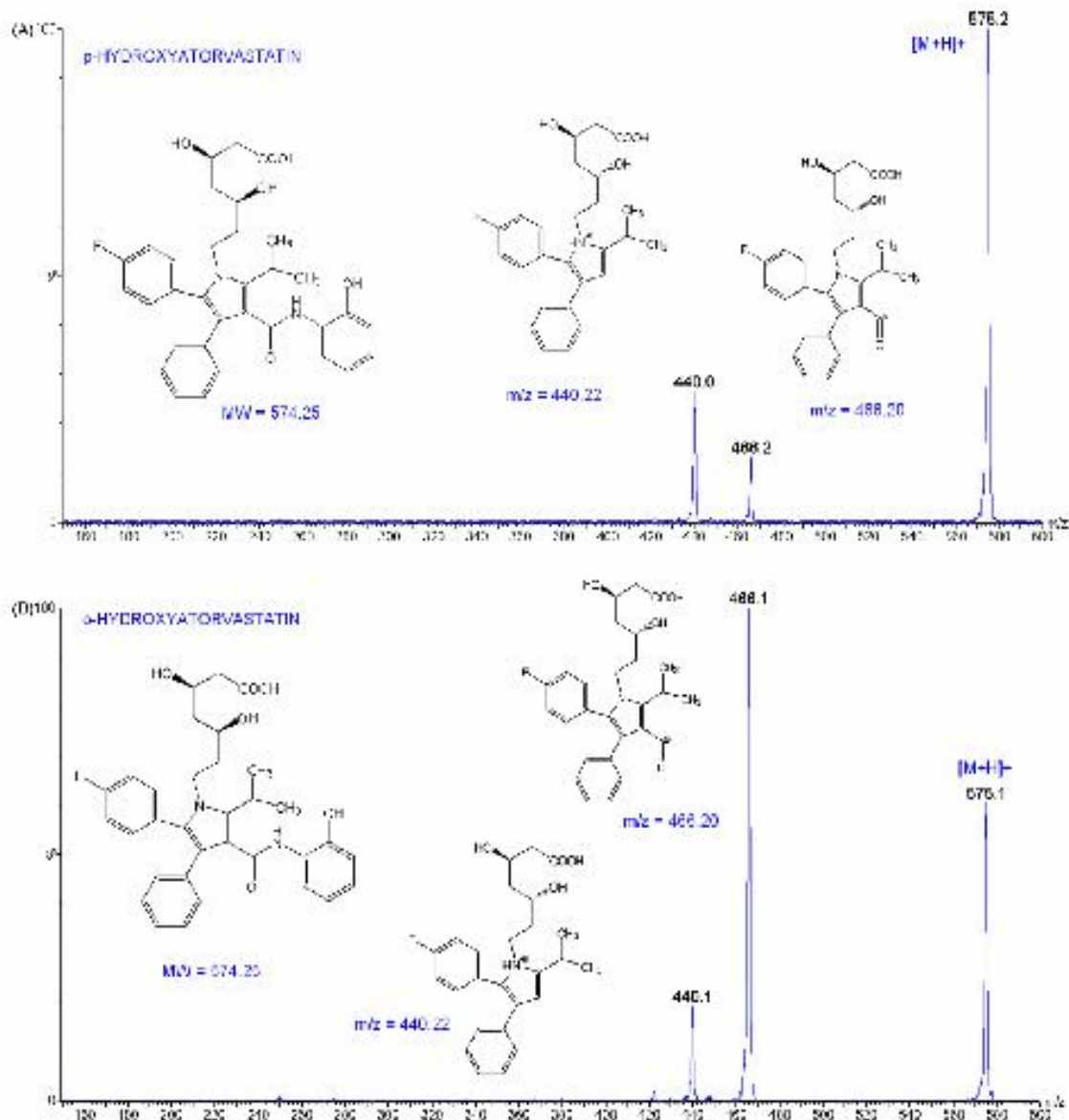


Fig. 5. Product ion spectra of p-hydroxyatorvastatin (A) and o-hydroxyatorvastatin (B).

Table 2
The results of SST, linearity and sensitivity test.

compound	t_R	Repeatability t_R [% RSD]	Repeatability A [% RSD]	Linearity [r^2]	LOQ [nmol/l]	LOD [nmol/l]
p-Hydroxyatorvastatin	2.40	0.27	6.29	0.9997	0.57	0.19
o-Hydroxyatorvastatin	2.80	0.18	1.40	0.9996	0.33	0.11
Atorvastatin	2.80	0.11	1.69	0.9990	0.15	0.05
Atorvastatin-deuterium labeled	2.80	0.18	2.06	0.9996	0.26	0.08
Atorvastatin lactone	3.19	0.21	1.44	0.9993	0.09	0.03
Simvastatin acid	3.48	0.15	4.67	0.9986	4.38	1.46
Simvastatin	4.30	0.12	1.76	0.9997	0.16	0.03
Simvastatin-deuterium labeled	4.40	0.16	1.11	0.9995	0.20	0.05

good stability at pH range 4–5 and volatility together with sensitive mass spectrometric response. In Fig. 2 there is an example of optimization given for atorvastatin, where the buffer pH and concentration in order to get the best S/N ratio of MS detector is performed. Other compounds gave similar response profile. Ammonium formate and ammonium acetate at pH 4.0 and 4.5 were tested at the concentration range 0.01–10 mmol/l. The best response was observed at 0.5 mmol/l buffers, which is in agreement with previously published works concerning the influence of additives—the concentrations higher than 5 mmol/l can significantly decrease the response of mass spectrometer [31]. On the other hand, the concentrations lower than 0.5 mmol/l were not sufficient to keep buffering capacity and they had negative influence to the response of mass spectrometer. Ammonium acetate was preferred before ammonium formate because of better peak shapes. Finally, the mobile phase composition was 70% of acetonitrile and 30% of ammonium acetate buffer 0.5 mmol/l pH 4.0.

In all cases protonated molecule $[M+H]^+$ was monitored in electrospray positive ionization mode. For atorvastatin and its metabolites it was the most intensive ion in mass spectra as published in many papers [22–25] before, however, concerning simvastatin there were strong discussion about the choice of precursor ion [15]. As proposed by Miao and Metcalfe [32], the addition of methylammonium acetate could enhance the formation of methylammonium adduct and that way highly enhance the sensitivity for quantitation using this adduct. In our experiment we did not observe any methylammonium adduct at all using this additive, thus protonated molecule was chosen for quantitation of simvastatin as well. Monitoring of adducts, such as $[M+Na]^+$ or $[M+CH_3CN+Na]^+$ is not correct in quantitative approach even if it was previously published [16–18].

Subsequently, all the parameters of mass spectrometer were finely tuned in order to get good sensitivity of precursor ion $[M+H]^+$ for all analytes—see Section 2.3. Cone voltage was set up individually for each analyte—the results could be seen in Table 1.

Quantitation of all analytes was performed in ESI positive ion mode using SRM mode. Two specific transitions were optimized for each molecule to increase selectivity and identification value of the method. Product ions were chosen according to the fragmentation pathways in Product ion scan mode—see Figs. 3–5. Argon was used as collision gas and collision energy was optimized for each analyte and for each of its two transitions individually in order to get high sensitivity—see Table 1.

3.2. Sample preparation

The sample preparation procedure was optimized using three different SPE sorbents—ZORBAX SPE C-18 (100 mg, 1 ml) (Agilent Technologies), Oasis HLB SPE (60 mg, 3 ml) (Waters), and Discovery DSC-18 (100 mg, 1 ml) (Supelco). Good results of recovery suitable for validation of the method were obtained with using Discovery DSC-18 SPE sorbents. Oasis HLB sorbent showed very different recovery values for atorvastatin (about 56%) and its metabolites (48–140%), thus it could not be used for their simultaneous determination. Sufficient and repeatable recoveries were observed for ZORBAX SPE C-18 but they were withdrawn from commercial market circulation. Serum sample preparation procedure was performed according to the procedure described in Section 2.5.

3.3. System suitability test and validation

The SST was performed by 10 subsequent injections of mixed solutions of standard mixture of statins at the concentration 10 nmol/l. Parameters such as the repeatability of reference standard solution injection were established (retentions times and peak areas were checked, the repeatability was expressed as RSD in %). SST results could be seen in Table 2.

3.3.1. Linearity—calibration range

Calibration curves of all analytes were measured in the concentration range 0.1–100 nmol/l, using seven calibration points (100,

Table 3
The results of validation—accuracy and precision.

Method validation		p-OH-AT	o-OH-AT	AT	ATL	SVA	SV
Accuracy [% recovery]	L1	84.9	65.3	86.0	93.2	78.1	75.6
	L2	89.3	74.4	84.6	91.8	90.5	98.8
	L3	78.8	86.0	86.4	78.5	100.0	89.6
Precision [% RSD] Intra-day	L1	1.5	1.2	1.0	0.8	0.6	9.8
	L2	3.8	3.3	1.6	2.8	4.5	8.6
	L3	8.4	4.7	6.7	11.8	1.8	9.1
Precision [% RSD] Inter-day	L1	2.5	3.9	10.6	6.6	3.5	6.9
	L2	5.5	11.2	10.4	3.2	15.3	6.6
	L3	9.2	4.3	13.7	8.9	11.9	9.6
Repeatability of calibration curve slope [% RSD]		6.0	16.9	14.4	8.4	7.1	9.9
Method selectivity		No interference	No interference	No interference	No interference	No interference	No interference

p-OH-AT = p-hydroxyatorvastatin, o-OH-AT = o-hydroxyatorvastatin, AT = atorvastatin, ATL = atorvastatin lactone, SVA = simvastatin acid, SV = simvastatin, OK = no matrix effect observed, L1, L2, L3 = concentration level 1, 2, 3 (10^{-7} to 10^{-9} mol/l).

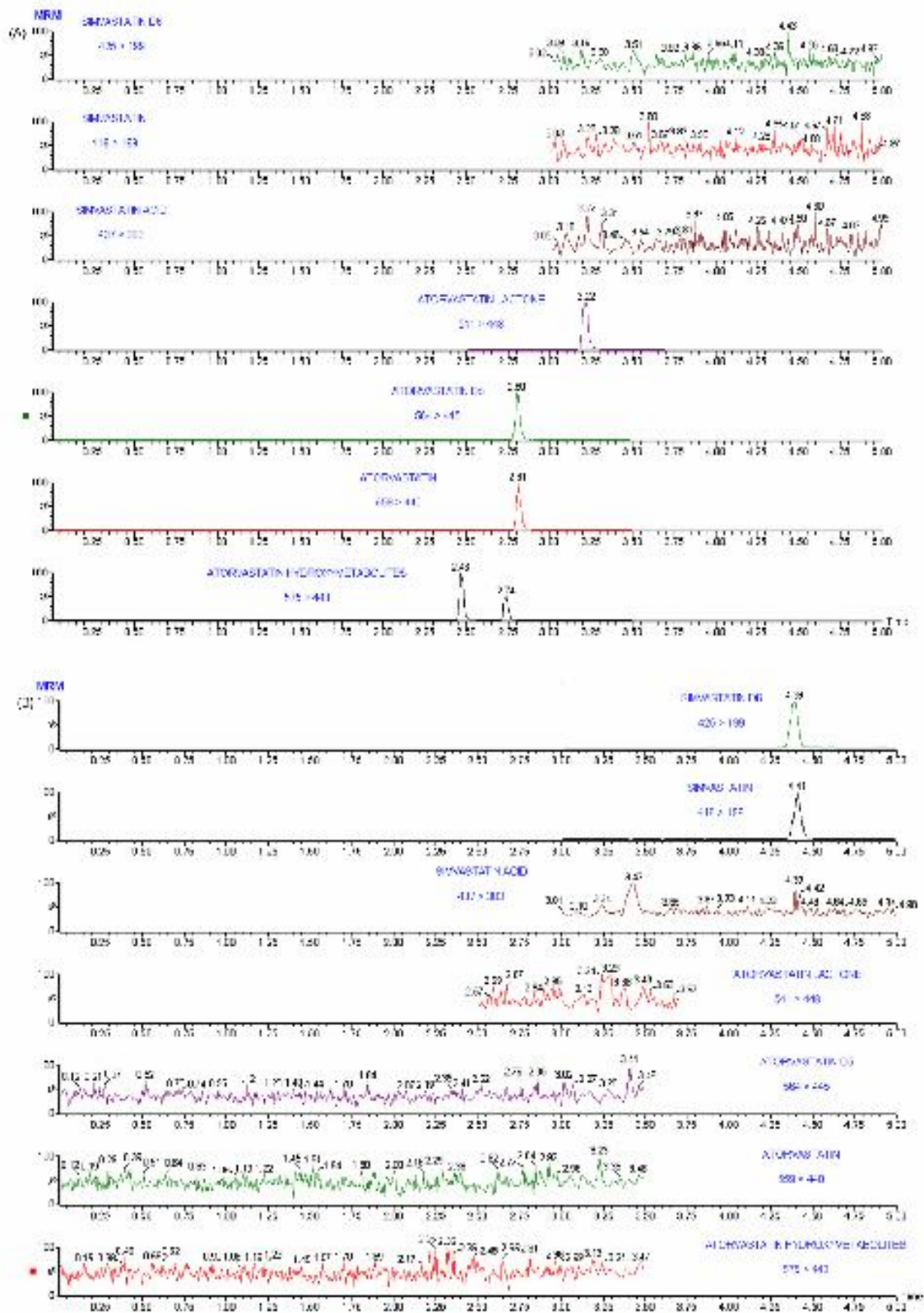


Fig. 6. Chromatogram of analysis of serum samples—patient on atorvastatin (A) and patient on simvastatin (B).

Table 4

Atorvastatin and metabolites in serum and lipoprotein fractions (VLDL, LDL, HDL) before and after hemodialysis displayed for patients 1 and 2. VLDL = very-low-density lipoprotein, LDL = low-density lipoprotein, HDL = high-density lipoprotein.

Atorvastatin and metabolites in serum and lipoprotein fractions (40 mg dosed)								
compound [nmol/l]		p-OH-AT	o-OH-AT	AT	ATL	SV	SVA	
Patient no. 1								
Before hemodialysis		serum	3.82	8.28	20.46	14.34	0	0
		VLDL	0.48	3.26	7.43	5.18	0	0
		LDL	0	2.04	3.4	3.63	0	0
		HDL	2.1	4.43	10.44	9.36	0	0
After hemodialysis		serum	0.40	2.56	3.03	5.64	0	0
		VLDL	0	1.27	0.13	1.01	0	0
		LDL	LOD	0.94	LOD	1.41	0	0
		HDL	LOD	1.60	1.63	4.40	0	0
Patient no. 2								
Before hemodialysis		serum	0.29	3.21	2.19	3.19	0	0
		VLDL	0.05	1.04	0.58	0.58	0	0
		LDL	0	0.74	0.19	0.24	0	0
		HDL	0	1.17	1.11	0.83	0	0
After hemodialysis		serum	0.24	1.95	1.38	0.92	0	0
		VLDL	0	0.8	1.07	0.27	0	0
		LDL	0	0.16	0.65	0.31	0	0
		HDL	0	1.18	1.83	0.89	0	0

50, 10, 5.0, 1.0, 0.5 and 0.1 nmol/l). Results concerning linearity can be seen in Table 2. Matrix calibration curves were prepared using the same calibration points by spiking blank serum samples with standard solutions and subsequent treatment by SPE preparation step. The linearity was found to be satisfactory for all compounds. Such calibration curves were used for quantitation purposes.

3.3.2. Accuracy and precision

Accuracy and precision were established by spiking blank serum samples at three levels of calibration curve—at high (10^{-7} mol/l), medium and low (10^{-9} mol/l) concentration using SPE step described in Section 3.2. Method precision was determined as intra-day and inter-day variability of three determinations at three different levels expressed as % RSD, see Table 3. Intra-day precision was generally within 10% RSD, while inter-day precision within 15% RSD. QC samples were prepared at the same concentration levels.

Method accuracy was determined as % of recovery using blank serum samples spiked with standard solutions treated by SPE extraction and blank serum samples treated by SPE extraction and subsequently spiked by the standard solution at three concentration levels—results could be seen in Table 3. Recovery typically ranged from 75 to 100%.

3.3.3. Method selectivity—matrix effects

For the determination of selectivity and measurement of matrix effects the injection of blank serum treated by the same sample preparation step was used. Matrix effects were established using direct inlet by Hamilton syringe, where standard mix solution was introduced to the mass spectrometer by direct infusion and the blank serum was injected by the autosampler to observe matrix suppressions or enhancements as positive or negative peaks influencing data plot of analytes. First, strong matrix effect was observed at retention time of atorvastatin and its metabolites. It was eliminated by the change of chromatographic conditions. Isocratic elution was changed to gradient profile, starting from 30% of acetonitrile, where statins are not eluted yet to allow interfering compounds from the matrix to be eluted. Thereafter the gradient was run up to 95% of acetonitrile to wash out all other possible interfering compounds—details in Section 2.2. Matrix effects were tested again using the same procedure. Neither negative nor positive peaks were observed at retention times of all analytes.

3.3.4. Limits of detection and quantitation

Limits of detection and quantitation were calculated based on S/N ratio. They were established first using standard solutions in mobile phase by the injection of the smallest amounts which provide S/N = 3. Subsequently this was confirmed by measurements in real matrix, which gave similar values. The results are displayed in Table 2. The method had excellent sensitivity to be able to perform the determination of statins in biological samples reaching LOQ 0.08–5.46 nmol/l and LOD 0.01–1.80 nmol/l.

3.4. Application to real samples

The samples of serum and lipoprotein fractions—HDL, LDL and VLDL were measured using developed UPLC-MS/MS method. A typical chromatogram could be seen in Fig. 6A and B, first transition, which was used for quantitation purpose is displayed. In patients using atorvastatin as a treatment both metabolites and also lactone form of atorvastatin were determined in all samples (Fig. 6A). In total, eight patients taking atorvastatin were included in our study. Atorvastatin levels typically found ranged from 1.33 to 20.46 nmol/l with 6.63 being a mean value. At patients taking simvastatin only simvastatin and simvastatin acid was determined in serum and lipoprotein fractions of patients (Fig. 6B). Only two patients taking simvastatin were included into the study. The levels of simvastatin were substantially lower, probably due to lower biological half-time, they were in the range 0.54–1.74 nmol/l.

The data from the first patient, who was treated by 40 mg of atorvastatin daily, are shown in detail in Table 4. High levels of atorvastatin and its metabolites were found in serum and lipoprotein fractions. The dose of 40 mg atorvastatin was administered at 9.00 p.m. The blood sampling was done the next morning before the start of hemodialysis at 7.00 a.m. The data from the second patient, who was treated by 40 mg of atorvastatin daily, are shown in Table 4 as well. Low levels of atorvastatin and its metabolites were found in serum and lipoprotein fractions. The dose of 40 mg atorvastatin was administered at 9.00 p.m. The blood sampling was done the next morning before the start of hemodialysis at 7.00 a.m.

A high inter-subject variability in pharmacokinetic parameters seen in this study is noteworthy. A high variability in statin kinetic parameters has also been observed in subjects without renal disease. Age, gender, food intake, and level of CYP3A4 expression and

activity all influence the body's handling of atorvastatin [33]. An important characteristic of CYP3A4 is the large inter-individual variability in activity (about 5-fold), which reflects genetic polymorphism combined with modulation by environmental factors [34]. Intake of known strong inhibitors or inducers of CYP3A4 did not occur in this study. However, in hemodialysis patients, who are polymedicated and have complex metabolic disturbances, uncharacterized interactions with concomitant drugs and endogenous substances may have contributed to the large variation in atorvastatin pharmacokinetic parameters.

4. Conclusions

Fast, sensitive and selective method for the determination of simvastatin, atorvastatin, its metabolites and interconversion products of both statins was developed. The method employed UPLC-MS/MS technique as a tool enabling high separation efficiency, speed of analysis and low solvent consumption. MS/MS detection utilized two SRM transitions for each compound to ensure high selectivity and reliability of the method. Deuterium labeled internal standards were used for the purposes of accurate and precise quantitation. Sample pretreatment of serum samples and lipoprotein fractions included stabilization by ammonium acetate buffer pH 4.0 during SPE sample preparation step. This was necessary to prevent the interconversion of analytes. Therefore ammonium acetate was also an inherent part of mobile phase during chromatographic separation. Its concentration was crucial in terms of the support of the ionization of statin molecules. While the concentration higher than 1 mmol decreased significantly ionization of statin molecules, the concentration lower than 0.5 mmol/l was not sufficient to ensure sufficient ionization, buffering capacity and the stability of analytes and therefore the response of mass spectrometer decreased.

The method was validated with good results for linearity (>0.9990, except of SVA), precision (RSD < 15% for all analytes), accuracy (recovery 75–100%) and selectivity showing no interferences with measured compounds. Analytes could be quantified at nmol/l concentrations with typical LOQ 0.09–0.57 nmol/l, except of SVA LOQ being 4.38 nmol/l. The method is applicable to analysis of serum samples and lipoprotein fractions containing atorvastatin or simvastatin. The advantage of the method was simultaneous determination of two clinically widely used statins—one chromatographic run and one sample preparation. It was not necessary to distinguish among the samples of patients and all samples could be analyzed using one procedure, which was very convenient for routine purposes.

This study revealed differences in the inter-individual processing of statins in hemodialysis patients with hyperlipidemia and

is addressing the clinically relevant information with respect to achieve adequate levels of exposure to active compound in this group of patients.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support of IGA MZ CR no. 1A/8689-4.

References

- [1] Y. Shitara, Y. Sugiyama, *Pharmacol. Ther.* 112 (2006) 71.
- [2] World Health Organization, *World Health Report, Report of the Director-General*, Geneva, WHO, 1998.
- [3] F.M. Sacks, *Am J. Cardiol.* 88 (Suppl.) (2001) 14N.
- [4] S. Bertolini, G.B. Bon, L.M. Campbell, M. Farnier, J. Lagan, G. Mahta, *Atherosclerosis* 130 (1997) 191–197.
- [5] S. Bellotti, R. Paoletti, A. Corsini, *Circulation* 109 (Suppl. III) (2004) 50.
- [6] R.L. Lins, E. Katalijine, G.A. Matthys, P.C. Verpoeten, M. Peeters, J.C. Drabwa, N.H. Stolear, Lameire, *Nephrol. Dial. Transplant* 18 (2003) 967.
- [7] C. Wanner, T. Quaschnig, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* 10 (2001) 195.
- [8] M.A. Touchette, R.L. Slaughter, *DiCP* 25 (1991) 1214.
- [9] R. Yuan, J. Venitz, *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 38 (2000) 245.
- [10] M. Jemal, Y.Q. Xia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 813.
- [11] D.J. Yang, L.S. Hwang, *J. Chromatogr. A* 1119 (2006) 277.
- [12] S. Ertürk, A. Onal, S.M. Cetin, *J. Chromatogr. B* 793 (2003) 193.
- [13] R. Nirogi, K. Mudigonda, V. Kandikere, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 379.
- [14] W. Jacobsen, B. Kuhn, A. Soldner, G. Kirchner, K.F. Sewing, P.A. Kollman, L.Z. Benet, U. Christians, *Drug. Metab. Dispos.* 28 (2000) 1369.
- [15] L. Nováková, D. Šatinský, P. Solich, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 352.
- [16] B. Barrett, J. Huclová, V. Bořek-Dobalský, B. Němec, I. Jelínek, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 517.
- [17] M. Jemal, Z. Ouyang, M.L. Powell, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 323.
- [18] H. Yang, Y. Feng, Y. Lu, *J. Chromatogr. B* 785 (2003) 369.
- [19] J.J. Zhao, A.Y. Yang, J.D. Rogers, *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 421.
- [20] A.Y. Yang, L. Sun, D.G. Musson, J.J. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 38 (2005) 521.
- [21] N. Zhang, A. Yang, J.D. Rogers, J.J. Zhao, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 175.
- [22] M. Jemal, Z. Ouyang, B.Ch. Chen, D. Teitz, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 13 (1999) 1003.
- [23] W.W. Bullen, R.A. Miller, R.N. Hayes, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 10 (1999) 55.
- [24] R.V.S. Nigori, V.N. Kandikere, M. Shukla, K. Mudigonda, S. Maurya, R. Boosi, Y. Anjaneyulu, *Biomed. Chromatogr.* 20 (2006) 924.
- [25] C.K. Van Pelt, T.N. Corso, G.A. Schultz, S. Lowes, J. Henion, *Anal. Chem.* 73 (2001) 582.
- [26] *European Pharmacopoeia*, 5th edition (Ph. Eur. 5), Council of Europe, Strasbourg, 2004.
- [27] *United States Pharmacopoeia 30*, United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, MD 20852, United States, 2007.
- [28] International Conference on Harmonization (ICH), Q2(R1): Text on Validation of Analytical Procedures, US FDA Federal Register, 2003.
- [29] P.S. Kruger, N.M. Freir, B. Venkatesh, T.A. Robertson, M.S. Roberts, M. Jones, *Intensive Care Med.* 35 (2009) 717.
- [30] J.T. Daugirdas, Simplified equations for monitoring Kt/V, PCRn, eKt/V and ePCRn, *Adv. Ren. Replac. Ther.* 2 (1995) 295.
- [31] M. Holcapek, K. Volna, P. Jandera, L. Kolarova, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 43.
- [32] X.S. Miao, Ch.D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 133.
- [33] A.P. Lea, D. McTavish, *Drugs* 53 (1997) 828.
- [34] K.E. Thummel, G.R. Wilkinson, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38 (1998) 389.

ZÁVĚR

Tato disertační práce se zabývá stanovením léčiv, jejich metabolitů a dalších biologicky aktivních látek v biologickém materiálu, zejména však přípravou vzorku k analýze s využitím moderních trendů v této oblasti. Tyto trendy vedou hlavně k plné automatizaci, nižší spotřebě vzorku i organických rozpouštědel, zrychlení celého kroku přípravy vzorku a zvýšení selektivity metody. Stanovování hladin léčiv a jejich metabolitů v tělních tekutinách patří v současné době k nejvíce se rozvíjejícím oblastem instrumentální analýzy, zejména z důvodu nutnosti monitorování, optimalizace a zefektivnění terapie některými preparáty a minimalizací jejich případných nežádoucích účinků. Kvůli obrovskému nárůstu počtu takovýchto vyšetření se staly tradiční techniky přípravy vzorku k analýze z velké části nevyhovujícími, a proto dochází k vývoji mnoha nových extrakčních technik. Analýza vzorků biologického materiálu je rovněž výrazně závislá na správném provedení preanalytické fáze, která nesmí být v žádném případě podceňována, neboť může výrazně ovlivnit výsledek vyšetření.

V teoretické části disertační práce je podrobně popsána problematika preanalytického ovlivnění výsledků a je upozorněno na možná úskalí, která mohou nastat ještě před samotnou analýzou vzorku v laboratoři. Dále zde byly stručně popsány nejčastěji používané tradiční techniky přípravy vzorku biologického materiálu k analýze, hlavní pozornost však byla věnována moderním extrakčním technikám.

Experimentální část disertační práce je rozdělena na dva tematické celky. V rámci prvního se podařilo vyvinout metodu pro současné stanovení vitamínu A a vitamínu E ve vzorku biologického materiálu (plazma a sérum) technikou HPLC s on-line extrakcí na předkoloně plněné RAM, zapojené do chromatografického systému technikou přepínání kolon. Přestože se jednalo o tzv. „home-made“ metodu, která využívala nízkotlaký 6-cestný přepínací ventil a z tohoto důvodu také monolitickou separační kolonu, podařilo se metodu zoptimalizovat a validovat. Zapojením moderní extrakční předkolony plněné RAM do chromatografického systému byla vyvinuta jednoduchá, plně automatizovaná, rychlá (v porovnání s off-line extrakční technikou s následnou chromatografickou analýzou) metoda, vhodná zejména do rutinních klinických provozů k analýze velkých sérií vzorků. Práce je příkladem využití jednoho z moderních trendů přípravy vzorku biologického materiálu k analýze přímo

v analytickém systému, který bude do budoucna pro své nesčetné výhody zajisté stále častěji využíván.

Druhý tematický celek experimentální části se zabývá vývojem, optimalizací a validací metod pro stanovení statinů (simvastatinu, atorvastatinu a jejich biologicky aktivních metabolitů) v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích. Osobně jsem se podílel na počátcích vývoje chromatografických metod pro stanovení statinů na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Původním záměrem bylo vyvinout metodu na co nejrozšířenější analytické instrumentaci, která by byla dostupná co největšímu počtu klinických laboratoří. Podařilo se vyvinout HPLC metodu s UV detekcí pro současné stanovení simvastatinu, jeho aktivního metabolitu ve formě hydroxykyseliny a atorvastatinu. Vzhledem k nízké odezvě UV detektoru však citlivost vyvinuté techniky zdaleka nedosahovala možnosti stanovit terapeutické hladiny těchto léčiv. Další výzkum se proto ubíral směrem HPLC s fluorescenční detekcí po předchozí derivatizační reakci, poté GC, v obou případech však stále s neuspokojivou citlivostí a špatnou reprodukovatelností nezbytné derivatizační reakce. Nakonec byla vyvinuta metoda využívající UPLC s MS detekcí, která jako jediná poskytla dostatečnou citlivost a reprodukovatelnost, s vysokou selektivitou a bez nutnosti derivatizace. Tím vývoj metod pro stanovení statinů v biologickém materiálu na našem pracovišti neskončil. Podařilo se vyvinout a validovat UPLC-MS/MS metodu pro stanovení nejen simvastatinu a atorvastatinu, ale současně také jejich biologicky aktivních metabolitů a produktů interkonverze v séru a v jednotlivých lipoproteinových frakcích po předchozí úpravě vzorku pomocí SPE. Vyvinutá metoda by měla pomoci individuálně optimalizovat terapii statiny u pacientů s těžkými formami hypercholesterolemie, zejména v kombinaci s extrakorporální aferézou tak, aby bylo dosaženo optimální účinné koncentrace s minimem nežádoucích vedlejších účinků a minimálními ztrátami léčiva z organismu plazmaferézou.

ZDROJE LITERATURY

1. T. Zima, Interní Med. 12 (2010) 490.
2. W.G. Guder, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 59 (1999) 545.
3. <http://www.labia.estranky.cz/clanky/preanalytika.html> (02/2012).
4. J. Racek a kol., Klinická biochemie, 2. vyd. Praha: Galen, 2006, 317 s., ISBN 80-7262-324-9.
5. T. Zima a kol., Laboratorní diagnostika, 2. vyd. Praha: Galen, 2007, 906 s., ISBN 978-7262-372-3.
6. V. Bartoš a kol., Preanalytická fáze 2005, 1. vyd. Praha: ČLS JEP: SEKK, 2005, 144 s., ISBN 80-239-5198-X.
7. S.J. Pocock, D. Ashby, A.G. Shaper, M. Walker, P.M. Broughton: J. Clin. Pathol. 42 (1989) 172.
8. <http://ukbd.fnhk.cz/preanalytika-toxikologie.html> (02/2012).
9. <http://ukbd.fnhk.cz/preanalytika-farmakologie.html> (02/2012).
10. SARSTEDT, spol. s.r.o., Jak na to: Praktická příručka odběru biologického materiálu.
11. M. Kailajarvi, T. Takala, P. Gronroos, N. Tryding, J. Viikari, K. Irjala, J. Forsstrom, Clin. Chem. 46 (2000) 1395.
12. <http://www.labia.estranky.cz/clanky/lekove-interference.html> (02/2012).
13. W.G. Guder, S. Narayama, H. Wisser, B. Zawta, Samples: from the patient to the laboratory: the impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results, 3. vyd. Darmstadt: Wiley, 2003, 102 s., ISBN: 3-527-30981-0.
14. Z. Mikšová, M. Froňová, M. Zajíčková, Kapitoly z ošetrovatelské péče II., 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006, 172 s., ISBN 80-247-1443-4.
15. <http://ukbd.fnhk.cz/odber-vzorku.html> (02/2012).
16. <http://wwwold.fnol.cz/main.jsp?id=564> (02/2012).
17. <http://www.fnhk.cz/fs162/lp-ukm.pdf> (02/2012).
18. <http://www.fnhk.cz/fs161/lp-ukia.pdf> (02/2012).
19. <http://www.fnhk.cz/fs160/lp-ukbd.pdf> (02/2012).
20. <http://www.fnhk.cz/fs157/lp-okhi.pdf> (02/2012).
21. <http://ukbd.fnhk.cz/preanalytika-molekularni-biologie.html> (02/2012).

22. Vyhláška MZ ČR č. 195/2005 Sb., kterou se upravují podmínky předcházení vzniku a šíření infekčních onemocnění a hygienické podmínky na provoz zdravotnických zařízení a ústavů sociální péče.
23. <http://www.imalab.cz/kategorie/preanalyticka-faze.aspx> (02/2012).
24. [http://www.stvincents.ie/dynamic/File/Draw%20Order\(1\).pdf](http://www.stvincents.ie/dynamic/File/Draw%20Order(1).pdf) (02/2012).
25. <http://www.zdravkaruska.estranky.cz/fotoalbum/laboratorni-vysetreni-biochemocke/vacutainer-2.jpg.html> (02/2012).
26. <http://www.sanglab.cz/pro-lekare/laboratorni-prirucka/a---uvod/a-2-obsah/> (02/2012).
27. M. Rozsypalová, E. Haladová, A. Šafránková, Ošetřovatelství II., 1. vyd. Praha: Informatorium, 2002, 239 s., ISBN 80-86073-97-1.
28. <http://www.biolab-kt.cz/soubory/manualOdberuBiolab.pdf> (02/2012).
29. R. Maďar, R. Podstatová, Med. Pro Praxi 4 (2006) 201.
30. <http://web2.endo.cz/cz/index.php/laboratorni-vykony/laboratorni-prirucka/4-odbery-primarnich-vzorku/> (02/2012).
31. B. Workman, C. Bennett, Klíčové dovednosti sester, 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2006, 259 s., ISBN 80-247-1714-X.
32. <http://www.bioregena.cz/laborator/odber-krve/37/index.html> (02/2012).
33. <http://wwwold.fnol.cz/main.jsp?id=611> (02/2012).
34. <http://ukb.lf1.cuni.cz/web/images/dokumenty/preanalytika2011.pdf> (02/2012).
35. http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/praktika/odber_krve.htm (02/2012).
36. <http://wwwold.fnol.cz/main.jsp?id=610> (02/2012).
37. <http://www.ikem.cz/www?docid=1005206> (02/2012).
38. J. Babjuk, F. Perlík, Z. Šídlo, Bioanalytika léků, 1. vyd. Praha: Avicenum, 1990, 272 s., ISBN 80-201-0083-0.
39. http://www.wikiskripta.eu/index.php/Odb%C4%9Bry_biologick%C3%A9ho_materi%C3%A1lu (02/2012).
40. <http://www.zshk.cz/files/odbery.pdf> (02/2012).
41. <http://www.flexweb.cz/bioregena/images/laborator/ml-metodicka-ujednani.pdf> (02/2012).
42. <http://www.wikiskripta.eu/index.php/Punkce> (02/2012).
43. <http://www.toplekar.cz/vysetreni/biopsie.html> (02/2012).
44. http://www.linkos.cz/slovnicek/?wizad_filter_item_glossary_name=biopsie (02/2012).
45. <http://analyt.wz.cz/Priprava/1.%20Priprava%20vzorku.pdf> (02/2012).
46. http://home.pf.jcu.cz/~pruvodce/download/labor_technika-skripta.pdf (02/2012).

47. Z. Glatz, Chem. Listy 94 (2000) 490.
48. J. Káš a kol., Laboratorní cvičení z biochemie, Nakladatelství Olomouc, 2000.
49. http://local.alfalaval.com/cs-cz/produkty/separace/filtrace/Documents/Membranova_filtrace_CS.pdf (02/2012).
50. http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/dialyza.html (02/2012).
51. <http://biomikro.vscht.cz/vyuka/ib/prednaska2.pdf> (02/2012).
52. http://www.med.muni.cz/patfyz/tmbg/Western_bak.pdf (02/2012).
53. L. Yang, N. Wu, R.P. Clement, P.J. Rudewicz, J. Chromatogr. B 799 (2004) 271.
54. J. Ma, J. Shi, H. Le, R. Cho, J.C.H. Juany, S. Miao, B.K. Wong, J. Chromatogr. B 862 (2008) 219.
55. J. Shin, D.F. Pauly, J.A. Johnson, R.F. Frye, J. Chromatogr. B 871 (2008) 130.
56. J. Wen, Y. Wu, L. Zhang, Y. Qi, G. Fan, Y. Wu, Z. Li, J. Chromatogr. 867 (2008) 153.
57. <http://analyt.wz.cz/Priprava/porovnaní.pdf> (02/2012).
58. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS4/hypertext/JVACO.htm (02/2012).
59. <http://www.umbr.cas.cz/~vacha/Vyuka/Metody/5hod%20Centrifugace.pdf> (02/2012).
60. http://imunologie.lf2.cuni.cz/soubory_vyuka/Izolace%20bunek%20a%20funkcni%20testy%20lymfocytu.pdf (02/2012).
61. <http://hplc1.sweb.cz/Vet/home.htm> (02/2012).
62. http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/cd_ds4/hypertext/AJAOF.htm (02/2012).
63. <http://analyt.wz.cz/Priprava/derivatizace-text.pdf> (02/2012).
64. G. Theodoridis, G.J. de Jong, Adv. Chromatogr. 43 (2005) 231.
65. E.E. Stashenko, J.R. Martínez, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 553.
66. D.R. Knapp, Handbook of Analytical Derivatisation Reactions, New York: Wiley, 1979, 741 s., ISBN 0-471-03469-X.
67. G. Lunn, L.C. Hellwig, Handbook of Derivatisation Reactions for HPLC, New York: Wiley, 1998, ISBN 978-0471164585.
68. T. Toyo'oka, Modern Derivatisation Methods for Separation Science, New York: Wiley, 1999. ISBN 978-0471983644.
69. R.M. Smith, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 3.
70. K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 36.
71. H. Kataoka, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 232.
72. S.X. Peng, T.M. Branch, S.L. King, Anal. Chem. 73 (2001) 357.
73. H.H. Liu, P.K. Dasgupta, Anal. Chem. 68 (1996) 1817.
74. Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, Ch. Qiu, J. Chromatogr. A 1184 (2008) 191.

75. F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, *Spectrochim. Acta, Part B* 64 (2009) 1.
76. D. M. Pavlovič, S. Babič, A.L.M. Horvat, J.K. Macan, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1062.
77. M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236.
78. L. Xu, Ch. Basheer, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 184.
79. M.A. Jeannot, A. Przyjazny, J.M. Kokosa, *J. Chromatogr. A* 217 (2010) 2326.
80. A. Jain, K.K. Verma, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 37.
81. F.F. Cantwell, M. Losier, Liquid–liquid extraction, in: J. Pawliszyn (Ed.), *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, 1. vyd. Amsterdam: Elsevier, 2002, 97–160, ISBN 0-444-50511-3.
82. E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
83. F. Kardani, A. Daneshfar, R. Sahrai, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2857.
84. A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651.
85. Y.C. Fiamegos, C.D. Stalikas, *Anal. Chim. Acta* 599 (2007) 76.
86. Y. He, A. Vargas, Y.J. Kang, *Anal. Chim. Acta* 589 (2007) 225.
87. M. Ma, F.F. Cantwell, *Anal. Chem.* 71 (1999) 388.
88. Z. Zhaohui, Z. Qian, K. Shaoying, C. Bo, M. Ming, Y. Shouzhuo, *Chinese J. Anal. Chem.* 34 (2006) 165.
89. Y. He, Y.J. Kang, *J. Chromatogr. A* 1133 (2006) 35.
90. H. Ebrahimzaden, Y. Yamini, A. Gholizade, A. Sedighi, S. Kasraee, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 193.
91. W. Gao, G. Chen, Y. Chen, N. Li, T. Chen, Z. Hu, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5712.
92. W. Gao, G. Chen, Y. Chen, X. Zhang, Y. Yin, Z. Hu, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 291.
93. W. Liu, H. K. Lee, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4462.
94. L. Xia, B. Hu, Z. Juany, Y. Wu, Y. Liang, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2910.
95. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650.
96. C. Basheer, H.K. Lee, J.P. Obbard, *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 161.
97. Q. Xiao, B. Hu, J.K. Duan, M. He, W.Q. Zu, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 18 (2007) 1740.
98. J.Å. Jönsson, Liquid membrane techniques, in: J. Pawliszyn (Ed.), *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*, 1. vyd. Amsterdam: Elsevier, 2002, 503–530, ISBN 0-444-50511-3.
99. E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565.

100. J. Lee, H.K. Lee, K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Anal. Chim. Acta* 624 (2008) 253.
101. H. Wu, H. Ku, J. Yen, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2288.
102. S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 132.
103. K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1.
104. A. Esrafil, Y. Yamini, S. Shariati, *Anal. Chim. Acta* 604 (2007) 127.
105. S. Cui, S. Tan, G. Ouyang, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2241.
106. D.F. de Freitas, C.E. Dobrovolskin Porto, E.P. Vieira, M.E. Pereira Bastos de Siqueira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 170.
107. M. Hadjmohammadi, H. Ghambari, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 44.
108. J. Xiong, J. Chen, M. He, B. Hu, *Talanta* 82 (2010) 969.
109. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
110. M. Razaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2342.
111. Ch. Xiong, J. Ruan, Y. Cai, Y. Tang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 572.
112. M.B. Melwanki, W.S. Chen, H.Y. Bai, T.Y. Lin, M.R. Fuh, *Talanta* 78 (2009) 618.
113. M. Baghdadi, F. Shemirani, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 56.
114. M.I. Leong, S.D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 8.
115. M.R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.A. Jönsson, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286.
116. R.E. Majors, *LC-GC N. Am.* 26 (2008) 1158.
117. B. Wang, T. Ezeji, H. Feng, H. Blaschek, *Chem. Eng. Journal* 63 (2008) 2595.
118. G.M. Nikolic, J.M. Perovic, R.S. Nikolic, M.M. Cakic, *Physics, Chemistry and Technology* 2 (2003) 293.
119. J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. Xie, *Anal. Chim. Acta* 679 (2010) 74.
120. J. Zhang, H. Wu, E. Kim, T.A. El-Shourbagy, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 419.
121. M. Holčapek, K. Volná, P. Jandera, L. Kolářová, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, *J. Mass Spectrom.* 39 (2004) 43.
122. A. Kankaanpää, R. Liukkonen, K. Ariniemi, *Forensic Sci. Int.* 170 (2007) 133.
123. M. Gupta, A. Jain, K.K. Verma, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 3774.
124. J. Zhang, R. Rodila, E. Gage, M. Hautman, L. Fan, L. L. King, H. Wu, T.A. El-Shourbagy, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 167.

125. F.J. Zhao, H. Tang, Q.H. Zhang, J. Yang, A.K. Davey, J.P. Wang, *J. Chromatogr. B* 881–882 (2012) 119.
126. A. Posyniak, J. Zmudzki, S. Semeniuk, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 89.
127. F. Toribio, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 101.
128. N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 394.
129. K.C. Saunders, A. Ghanem, H.W. Boon, F. Hilder, P.R. Haddad, *Anal. Chim. Acta* 652 (2009) 22.
130. M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3.
131. P.L. Buldini, L. Ricci, J.L. Sharma, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 47.
132. M.E. Lindsey, M. Meyer, E.M. Thurman, *Anal. Chem.* 73 (2001) 4640.
133. W.W. Buchberger, *Anal. Chim. Acta* 593 (2007) 129.
134. S. Weigel, R. Kallenborn, H. Hühnerfuss, *J. Chromatogr. A* 1023 (2004) 183.
135. C.L. Artur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145.
136. Y. Saito, Y. Nakao, M. Imaizumi, Y. Morishima, Y. Kiso, K. Jinno, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 81.
137. L. Xu, Z.G. Shi, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3345.
138. S. Ulrich, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 167.
139. A. Kumar, Gaurav, A.K. Malik, D.K. Tewary, B. Singh, *Anal. Chim. Acta* 610 (2008) 1.
140. X. Hu, J. Pan, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 190.
141. I. Falch (Ed.), *The Reporter (Europe)* 22, Sigma-Aldrich (2006) 12.
142. Z.G. Shi, F. Chen, J. Xing, Y.Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5333.
143. B.B. Prasad, M.P. Tiwari, R. Madhuri, P.S. Sharma, *Anal. Chim. Acta* 662 (2010) 14.
144. L.J. Krutz, S.A. Senseman, A.S. Sciumbato, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 103.
145. H.M. Liebich, E. Gesele, J. Wöll, *J. Chromatogr. B* 713 (1998) 427.
146. Z.Y. Zhang, J. Poerschmann, J. Pawliszyn, *Anal. Commun.* 33 (1996) 219.
147. P. Olszowy, M. Szultka, T. Ligor, J. Nowaczyk, B. Buszewski, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2226.
148. P. Olszowy, M. Szultka, P. Fuchs, R. Kegler, R. Mundkowski, W. Miekisch, J. Schubert, B. Buszewski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53 (2010) 1022.
149. O. Mastrogianni, G. Theodoridis, K. Spagou, D. Violante, T. Henriques, A. Pouliopoulos, K. Psaroulis, H. Tsoukali, N. Raikos, *Forensic Sci. Int.* 215 (2012) 105.
150. Y. He, J. Pohl, R. Engel, L. Rothman, M. Thomas, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4824.

151. <http://www.brechbuehler.ch/SPME-Mode.204.0.html> (03/2012).
152. R. Eisert, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140.
153. H. Kataoka, S. Narimatsu, H.L. Lord, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4237.
154. Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, Z.G. Shi, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 251.
155. Y. Fan, Y.Q. Feng, S.L. Da, Z.H. Wang, *Talanta* 65 (2005) 111.
156. W.M. Mullett, K. Levsen, D. Lubda, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 325.
157. Y. Wen, Y. Wang, Y.Q. Feng, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 2874.
158. Y. Wen, Y. Fan, M. Zhang, Y.Q. Feng, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 204.
159. M. Zhang, F. Wei, Y.F. Zhang, J. Nie, Y.Q. Feng, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 294.
160. D. Luo, F. Chen, K. Xiao, Y. Q. Feng, *Talanta* 77 (2009) 1701.
161. F. Wei, M. Zhang, Y.Q. Feng, *Electrophoresis* 27 (2006) 1939.
162. H. Lord, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 17.
163. B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. B* 862 (2008) 181.
164. L.P. Melo, R.H.C. Queiroz, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2454.
165. A.R. Chaves, B.J.G. Silva, F.M. Lanças, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3376.
166. S. Lambert, *Chromatography Today*, June (2009) 12.
167. S. Miyazaki, K. Morisato, N. Ishizuka, H. Minakuchi, Y. Shintani, M. Furuno, K. Nakanishim, *J. Chromatogr A* 1043 (2004) 19.
168. Z. Altun, C. Skoglund, M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2581.
169. Z. Altun, L.G. Blomberg, M. Abdel-Rehim, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 1477.
170. S.S. Liang, S.H. Chen, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2282.
171. L.G. Blomberg, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 797.
172. C. Hasegawa, T. Kumazawa, X.P. Lee, A. Marumo, N. Shinmen, H. Seno, K. Sato, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 563.
173. T. Kumazawa, C. Hasegawa, X.P. Lee, K. Hara, H. Seno, O. Suzuki, K. Sato, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 602.
174. Z. Altun, A. Hjelmström, M. Abdel-Rehim, L.G. Blomberg, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 1964.
175. M. Abdel-Rehim, C. Persson, Z. Altun, L.G. Blomberg, *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 23.
176. W. Xie, C.M. Chavez-Eng, W. Fang, M.L. Constanzer, B.K. Matuszewski, W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 1457.

177. T. Nissilä, N. Backman, M. Kolmonen, A. Leinonen, A. Kiriazis, J. Yli-Kauhaluoma, L. Sainiemi, R. Kostianen, S. Franssila, R.A. Ketola, *Int. J. Mass Spectrom.* 310 (2012) 65.
178. K.W. Ro, R. Nayak, D.R. Knapp, *Electrophoresis* 27 (2006) 3547.
179. K.A. Wolfe, M.C. Breadmore, J.P. Ferrance, M.E. Power, J.F. Conroy, P.M. Norris, J.P. Landers, *Electrophoresis* 23 (2002) 727.
180. Q. Wu, J.M. Bienvenue, B.J. Hassan, Y.C. Kwok, B.C. Giordano, P.M. Norris, J.P. Landers, J.P. Ferrance, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5704.
181. M.D. Kulinski, M. Mahalanabis, S. Gillers, J.Y. Zhang, S. Singh, C.M. Klapperich, *Biomed. Microdevices* 11 (2009) 671.
182. A. Bhattacharyya, C.M. Klapperich, *Anal. Chem.* 78 (2006) 788.
183. E.A. Moschou, A.D. Nicholson, G. Jia, J.V. Zoval, M.J. Madou, L.G. Bachas, S. Daunert, *Anal. Bioanal. Chem.* 385 (2006) 596.
184. Y. Xu, J. Zhang, W.P. Zhang, Z.F. Zhang, Z.Y. Wen, *Chem. J. Chin. Univ.* 29 (2008) 892.
185. Y. Xu, P.Z. Xu, Q. Cao, Q. Lu, Z.Y. Wen, *Chin. J. Anal. Chem.* 36 (2008) 1636.
186. Y. Yang, C. Li, J. Kameoka, K.H. Lee, H.G. Craighead, *Lab. Chip* 5 (2005) 869.
187. M. Abdel-Rehim, Z. Altun, L. Blomberg, *Mass. Spectrom.* 39 (2004) 1488.
188. <http://chromservis.cz/category/meps?lang=CZ> (02/2012).
189. Z. Altun, M. Abdel-Rehim, L. G. Blomberg, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 129.
190. M. Abdel-Rehim, Z. Altun, L. Blomberg, *J. Mass. Spectr.* 39 (2004) 1488.
191. M. Vita, P. Skansen, M. Hassan, M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. B* 817 (2005) 303.
192. M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317.
193. M. Abdel-Rehim, *Anal. Chim. Acta*, 701 (2011) 119.
194. R. Said, A. Pohanka, M. Andersson, O. Beck, M. Abdel-Rehim, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 815.
195. R. Mandrioli, L. Mercolini, D. Lateana, G. Boncompagni, M.A. Raggi, *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 167.
196. H. Vlčková, D. Solichová, M. Bláha, P. Solich, L. Nováková, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 55 (2011) 301.
197. A.R. Chaves, F.Z. Leandro, J.A. Carris, M.E.C. Queiroz, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 2123.
198. J. Lipinski, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 369 (2001) 57.
199. http://www.unichrom.cn/e_product_f.asp?id=650 (02/2012).

200. <http://www.labicom.cz/spde-86/> (02/2012).
201. H. Kataoka, *Curr. Pharm. Anal.* 1 (2005) 65.
202. K. Ridgway, S.P.D. Lalljie, R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1124 (2006) 181.
203. F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *J. Chromatogr. A* 958 (2002) 231.
204. F. Musshoff, D.W. Lachenmeier, L. Kroener, B. Madea, *Forensic Sci. Int.* 133 (2003) 32.
205. D. Lenz, L. Kröner, M.A. Rothschild, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 4090.
206. A. Namera, A. Nakamoto, M. Nishida, T. Saito, I. Kishiyama, S. Miyazaki, M. Zajata, M. Yashiki, M. Nagao, *J. Chromatogr. A* 1208 (2008) 71.
207. O.G. Potter, E.F. Hilder, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1881.
208. A. Namera, A. Nakamoto, T.Saito, S. Miyazaki, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 901.
209. T. Saito, S. Morita, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, M. Nagao, S. Inokuchi, *J. Chromatogr. B* 872 (2008) 186.
210. T. Saito, R. Yamamoto, S. Inoue, I. Kishiyama, S. Miyazaki, A. Nakamoto, M. Nishida, A. Namera, S. Inokuchi, *J. Chromatogr. B* 867 (2008) 99.
211. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 737.
212. J. P. Lambert, W.M. Mullett, E. Kwong, D. Lubda, *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 43.
213. X. Huang, D. Yuan, B. Huang, *Talanta* 75 (2008) 172.
214. B. Tienpont, F. David, T. Benijts, P. Sandra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 569.
215. C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, P. Rubiolo, B. Sgorbini, F. David, P.Sandra, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 9.
216. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 2642.
217. N. Ochiai, K. Sasamoto, S. Daishima, A.C. Heiden, A. Hoffmann, *J. Chromatogr. A* 986 (2003) 101.
218. P.L. Kole, J. Millership, J.C. McElnay, *Talanta* 85 (2011) 1948.
219. H.M. Quinn, J.J. Takarewski, *Int. Pat. WO 97/16724* (1997).
220. J. Ayrton, G.J. Dear, W.J. Leavens, D.N. Mallett, R.S. Plumb, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 1953.
221. S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 141.
222. W. Zeng, A.L. Fisher, D.G. Musson, A.Q. Wang, *J. Chromatogr. B* 806 (2004) 177.
223. B. Kinsella, J. O'Mahony, E. Malone, M. Moloney, H. Cantwell, A. Furey, M. Danaher, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7977.

224. W. Zeng, D.G. Musson, A.L. Fischer, L. Chen, M.S. Schwarz, E.J. Woolf, A.Q. Wang, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46 (2008) 534.
225. S. Souverain, S. Rudaz, D. Ortelli, E. Varesio, J.L. Veuthey, *J. Chromatogr. B* 784 (2003) 117.
226. A.R. Breaud, R. Harlan, J.M. Di Bussolo, G.A. McMillin, W. Clarke, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 825.
227. D.R. Bunch, C. Heideloff, J.C. Ritchie, S. Wang, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 3255.
228. L. Ynddal, S.H. Hansen, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 59.
229. C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, *J. Chromatogr.* 544 (1991) 25.
230. <http://www.registech.com/InfoPages/RAMInfo/Figures/figure3.html> (03/2012).
231. T. Kanda, H. Kutsuna, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 51.
232. J. Haginaka, J. Wakai, *Chromatographia* 29 (1990) 223.
233. D.E. Williams, M.P. Kabra, *Anal. Chem.* 62 (1990) 807.
234. I.H. Hagestam, T.C. Pinkerton, *Anal. Chem.* 57 (1985) 1757.
235. T.C. Pinkerton, *J. Chromatogr. A* 544 (1991) 13.
236. S.E. Cook, T.C. Pinkerton, *J. Chromatogr. A* 368 (1986) 233.
237. S. Vielhauer, A. Rudolphi, K.S. Boos, D. Seidel, *J. Chromatogr. B* 666 (1995) 315.
238. D.J. Gisch, B.T. Hunter, B. Feibush, *J. Chromatogr. B* 433 (1988) 264.
239. B. Feibush, C.T. Santasania, *J. Chromatogr. A* 544 (1991) 41.
240. J. Haginaka, *Trends Anal. Chem.* 10 (1991) 17.
241. J. Hermansson, A. Grahn, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 119.
242. <http://www.shodex.com/english/da1204.html> (03/2012).
243. D. Šatínský, P. Solich, J. Huclová, R. Karlíček, *Analyst* 128 (2003) 351.
244. E. Riva, R. Merati, L. Cavenaghi, *J. Chromatogr.* 553 (1991) 35.
245. A. Haque, J.T. Stewart, *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999) 51.
246. P. Sadílek, D. Šatínský, P. Solich, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 375.
247. L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 3.
248. L.I. Andersson, *J. Chromatogr. B* 739 (2000) 163.
249. O. Ramstrom, L. Ye, M. Krook, K. Mosbach, *Anal. Commun.* 35 (1998) 9.
250. F. Lanza, B. Sellergren, *Chromatographia* 53 (2001) 599.
251. A. Beltran, F. Borrull, R.M. Marcé, P.A.G. Cormack, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 1363.
252. H. Kawaguchi, Y. Hayatsu, H. Nakata, Y. Ishii, R. Ito, K. Saito, *Anal. Chim. Acta* 539 (2005) 83.

253. A. Zander, P. Findlay, T. Renner, B. Sellergren, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3304.
254. Y.W. Tang, Z.F. Juany, T. Yang, X.G. Hu, X.O. Juany, *Anal. Lett.* 38 (2005) 219.
255. Z.F. Huang, Y.W. Tang, *Clin. J. Anal. Chem.* 33 (2005) 1424.
256. E. Caro, R.M. Marcé, P.A.G. Cormak, D.C. Sherrington, F. Bortil, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 207.
257. R.N. Rao, P.K. Maurya, S. Khalid, *Talanta* 85 (2011) 950.
258. T. Alizadeh, M. Akhoundian, *Electrochim. Acta* 55 (2010) 5867.
259. M. Javanbakht, A.M. Attaran, M.H. Namjumanesh, M. Esfandyari-Manesh, B. Akbari-adergani, *J. Chromatogr. B* 878 (2010) 1700.
260. <http://www.biotage.com/DynPage.aspx?id=93581> (03/2012).
261. N. Delaunay-Bertoncini, V. Pichon, M.C. Hennion, *LC–GC Europe* 14 (2001) 162.
262. N. Delaunay-Bertoncini, V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. B* 745 (2000) 15.
263. V. Pichon, M. Bouzige, C. Miège, M.C. Hennion, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 219.
264. M.C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 29.
265. A.A.M. Stolker, P.L.W.J. Schwillens, L.A. van Ginkel, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 893 (2000) 55.
266. B.A. Rashid, P. Kwasowski, D. Stevenson, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 635.
267. S. Kerrigan, D.E. Brooks, *J. Immunol. Methods* 224 (1999) 11.
268. B.A. Rashid, G.W. Aherne, M.F. Katmeh, P. Kwasowski, D. Stevenson, *J. Chromatogr. A* 797 (1998) 245.
269. P. D’Orazio, *Clin. Chim. Acta* 334 (2003) 41.
270. T. Hermann, D.J. Patel, *Science* 287 (2000) 820.
271. T.H. Nguyen, R. Pei, M. Stojanovic, Q. Lin, *Microfluid Nanofluid* 6 (2009) 479.
272. S. Jayasena, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1628.
273. M.N. Stojanovic, P. de Prada, D.W. Landry, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 4828.
274. B. Madru, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *Talanta* 85 (2011) 616.
275. J. Cai, J. Henion, *J. Chromatogr. B* 691 (1997) 357.
276. <http://www.hplc.com/Shodex/english/dc100301.htm> (03/2012).
277. J.B. Lecaillon, C. Souppart, *J. Chromatogr.* 497 (1989) 223.
278. E. Takahara, H. Fukuoka, K. Takali, O. Nagata, *J. Chromatogr.* 576 (1992) 174.
279. J.B. Lecaillon, N. Febvre, C. Souppart, *J. Chromatogr.* 317 (1984) 493.
280. J.V. Posluzny, R. Weinberger, E. Woolf, *J. Chromatogr.* 507 (1990) 267.
281. W.M. Mullett, J. Pawliszyn, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 899.
282. H. Zeng, Y. Deng, J.T. Wu, *J. Chromatogr. B* 788 (2003) 331.

283. W.R. Baeyens, G. Van Der Weken, J. Haustaete, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 153.
284. T. Gordi, E. Nielsen, Z. Yu, D. Westerlund, *J. Chromatogr. B* 742 (2000) 155.
285. Q. Song, L. Putcha, *J. Chromatogr. B* 763 (2001) 9.
286. V.K. Boppana, C. Miller-Stein, W.H. Schaefer, *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 227.
287. C. Schafer, D. Lubda, *J. Chromatogr. A* 909 (2001) 73.
288. Y.Q. Xia, D.B. Whigan, M. Powell, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 14 (2000) 105.
289. F.X. Zhou, I.S. Krull, B. Feibush, *J. Chromatogr.* 609 (1992) 103.
290. A. Walhagen, L.E. Edholm, *J. Chromatogr.* 473 (1989) 371.
291. C.Y. Hsieh, J. Huang, *J. Chromatogr.* 575 (1992) 109.
292. Y. Oda, N. Asakawa, T. Kajima, *Pharm. Res.* 8 (1991) 997.
293. C. Julien, C. Rodríguez, G. Cuisinaud, *J. Chromatogr.* 344 (1985) 51.
294. L.R. Snyder, J.W. Dolan, S. Van Der Wal, *J. Chromatogr.* 203 (1981) 3.
295. A. Nazarth, L. Jaramillo, B.L. Karger, *J. Chromatogr.* 309 (1984) 357.