

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



Charakteristika a aplikace podporované kapalinové extrakce

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Hana Chrástková

Vedoucí bakalářské práce: PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ, 2016

Prohlášení

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

V Hradci Králové

Hana Chrástková

Poděkování

Na tomto místě děkuji PharmDr. Lucii Chocholoušové Havlíkové, Ph.D. za vstřícný přístup, ochotu a trpělivost, kterou mi věnovala při vedení mé bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod.....	- 8 -
2	Cíl a popis zadání práce	- 9 -
3	Separační metody	- 10 -
3.1	Extrakce	- 11 -
3.1.1	Extrakce z kapaliny do kapaliny	- 11 -
3.1.2	Extrakce na tuhou fázi.....	- 12 -
4	Podporovaná kapalinová extrakce.....	- 14 -
4.1	Princip metody.....	- 14 -
4.2	Křemelina	- 15 -
4.3	Dostupnost na trhu.....	- 16 -
4.4	Vysolovací podporovaná kapalinová extrakce	- 17 -
4.4.1	Provedení extrakce	- 18 -
4.4.2	Výhody použití acetonitrilu.....	- 18 -
4.4.3	Volba vhodné soli	- 18 -
4.4.4	Vyhodnocení	- 18 -
5	Porovnání extrakčních metod.....	- 19 -
5.1	Stanovení sitagliptinu a simvastatinu	- 19 -
5.2	Stanovení β -blokátorů a nesteroidních antiflogistik.....	- 22 -
5.3	Vliv podporované kapalinové extrakce na snížení vlivu matrice a zlepšení extrakční účinnosti	- 23 -
6	Aplikace podporované kapalinové extrakce	- 25 -
6.1	Extrakce aldosteronu	- 25 -
6.2	Stanovení erlotinibu v lidské plazmě	- 26 -
6.3	Stanovení elvitegraviru a ritonaviru v krysí plazmě.....	- 27 -
6.4	Analýza návykových látek	- 28 -
6.5	Použití v kosmetickém průmyslu	- 29 -

6.6	Analyza polyfenolů ve víně.....	- 31 -
7	Závěr	- 33 -
	SEZNAM OBRÁZKŮ	- 34 -
8	Bibliografie	- 35 -
	PŘÍLOHA	

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
DAD	Detektor s diodovým polem (Diode array detector)
DCM	Dichlormethan
EtOAc	Ethylacetát
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography)
IPA	Isopropylalkohol
i.s.	Vnitřní standard (Internal Standard)
LC-ESI-MS/MS	Kapalinová chromatografie-ionizace elektrosprejem-tandem hmotnostních spektrometrů
LDL	Lipoproteiny o velmi nízké hustotě (Low density lipoprotein)
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid extraction)
LLOQ	Spodní limit kvantifikace (Lower Limit of Quantification)
MA	Methylamfetamin, pervitin
MeOH	Methanol
MDMA	Methylendioxymethylamfetamin, extáze
MTBE	Methyltercbutylether
NSAIDs	Nesteroidní antiflogistika (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)
PPT	Proteinová precipitace (Protein precipitation)
PTFE	Polytetrafluorethylen
QC (samples)	Vzorky pro kontrolu kvality (Quality Control samples)
QuEChERS	Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe (analytická metoda)

SLE	Podporovaná kapalinová extrakce (Supported liquid extraction)
SOSLE	Vysolovací podporovaná kapalinová extrakce (Salting out supported liquid extraction)
SPE	Extrakce na tuhou fázi (Solid-phase extraction)
THC	Delta-9-tetrahydrocannabinol
UHPLC	Ultravysokoučinná kapalinová chromatografie (Ultra High Performance Liquid Chromatography)

1 Úvod

Tématem této bakalářské práce je podporovaná kapalinová extrakce. Jedná se o relativně nedávno vyvinutou metodu, jejímž cílem je oddělit stanovovanou látku ze směsi jiných látek nebo ze složité biologické matrice (např. krevní plazma, sérum). Podporovaná kapalinová extrakce je modifikací rutinně používané metody - extrakce z kapaliny do kapaliny.

Metoda extrakce z kapaliny do kapaliny má některé nedostatky, které tato nová metoda kompenzuje. Využití podporované kapalinové extrakce přináší například nižší spotřebu organických rozpouštědel, nedochází k tvorbě kapiček emulzí, které by falešně snižovaly koncentraci analytu v původním vzorku. Taktéž je tato nová metoda časově méně náročná, snadno automatizovatelná a je třeba podstoupit nižší počet kroků, než je u současně používaných metod.

V současné době je tato metoda používaná hlavně v oblasti výzkumné, ale již jsou vyvinuté a validované pracovní postupy i pro rutinní použití, avšak k rozšíření podporované kapalinové extrakce do běžného rutinního provozu zatím nedošlo.

2 Cíl a popis zadání práce

Smyslem této práce je seznámit se s principem a využitím jedné z metod úpravy vzorků v analytické chemii - podporovanou kapalinovou extrakcí (SLE).

Bakalářská práce je rozdělena do čtyř hlavních částí. První část obsahuje informace o extrakci jakožto separační metodě, o zařazení extrakce mezi analytické separační metody a o přehledu základních principů extrakcí, které se v analytické chemii pro úpravu vzorku před vlastní analýzou běžně používají. Druhá část se zabývá principem podporované kapalinové extrakce. Třetí část je zaměřena na porovnání s jednotlivými druhy extrakcí (extrakce na tuhou fázi, extrakce z kapaliny do kapaliny) a poslední čtvrtá část popisuje praktické využití podporované kapalinové extrakce.

3 Separční metody

Extrakce se řadí mezi separční metody analytické chemie. Cílem separčních metod je izolovat stanovovaný analyt ze směsného vzorku. Případně opačně je možné oddělit ostatní složky směsi od analytu (tzv. přečištění analytu), čímž lze eliminovat možnost vzniku nežádoucích interferencí během následné analýzy (1).

Separční metody musí splňovat několik kritérií. Musí být selektivní, to znamená, že rozdělují směs analytů na základě jejich fyzikálních nebo chemických vlastností. Dalším kritériem je rozsah použitelnosti, který udává, pro jaký druh látek je metoda určena (např. pro organické látky, anorganické látky, ionty, makromolekuly...). Posledním kritériem je frakcionační kapacita, která sděluje, kolik látek je možné v jednom kroku separovat (2).

Separční metody je možno rozdělit do dvou kategorií. Do první kategorie lze zařadit separace založené na různé distribuci složek mezi dvěma fázemi. Možné kombinace těchto dvoufázových systémů jsou v následující tabulce (1).

Tabulka 1 Přehled separčních metod založených na různé distribuci složek mezi dvěma fázemi.

	Plyn-kapalina	Plyn-pevná látka	Kapalina-kapalina	Kapalina-pevná látka
Separční techniky	Destilace, Plynová chromatografie	Sublimace, Plynová chromatografie	LLE Kapalinová chromatografie	Frakční krystalizace, Kapalinová chromatografie, SPE, Molekulová síta

Do druhé kategorie řadíme metody, pomocí nichž probíhá separace na základě rozdílných rychlostí pohybu jednotlivých složek. Zde rozlišujeme separace pomocí membrán (ultrafiltrace, dialýza, obrácená osmóza a elektrodialýza) a separace elektrickým polem (elektroforéza, izotachoforéza, ultracentrifugace, hmotnostní spektrometrie, termodifuze a frakcionace v silovém poli) (1), (2).

3.1 Extrakce

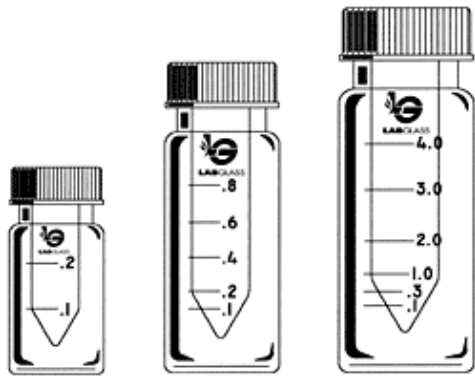
Extrakční metody jsou používány k úpravě vzorku před vlastní analýzou. V této kapitole se zaměřím na dvě metody extrakce, a to extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakci na tuhou fázi (SPE). LLE a SPE metody slouží kromě separace látek také k zakoncentrování analytu v menším objemu rozpouštědla, přečištění vzorku a odstranění většiny balastních látek. Obě tyto metody jsou hojně používány v rutinních analýzách laboratoří různého zaměření.

3.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

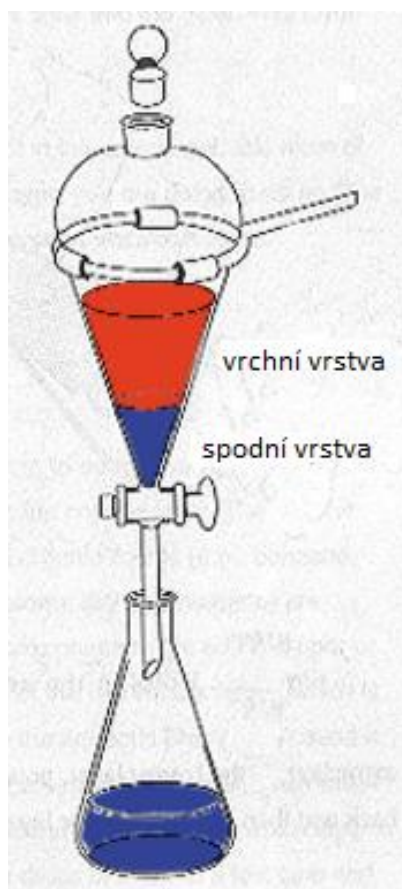
Pomocí extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) lze oddělit kapalné analyty na základě hodnot jejich rozdělovacích poměrů mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Tento koeficient udává poměr koncentrací analytu v organické a vodné fázi. Podstatou metody je tedy převedení analytu z polární (vodné) fáze do fáze organické, ve které je možné analyt stanovit. Ovšem, je třeba si uvědomit fakt, že do organické fáze mohou přecházet pouze elektroneutrální látky, proto je nezbytné upravit hodnotu pH vodné fáze tak, aby byl stanovovaný analyt ve své neionizované formě (1), (3).

Jinou možností aplikace LLE je acidobazická extrakce. Jedná se o děj, během kterého jsou organické látky s kyselými či bazickými funkčními skupinami extrahovány z organického prostředí do anorganického roztoku (kyselého nebo zásaditého). Rozpustnost takových organických sloučenin ve vodě je omezená, nicméně je možné ji zvýšit pomocí neutralizačních reakcí. Neutralizační reakce vedou k tvorbě iontových solí, které jsou ve vodě rozpustné. Takto lze docílit úplné distribuce původně nepolárního analytu do vodné fáze (4).

V závislosti na objemu extrahovaného roztoku volíme vhodnou extrakční aparaturu. Malé objemy lze extrahovat v kónické vialce (4). Manuální provedení LLE neboli vytřepávání za pomoci dělicí nálevky má řadu nevýhod. Jedná se například o vysoké spotřeby organických látek, tvorbu emulzí na fázovém rozhraní, časovou náročnost a obtížnou automatizaci celého postupu (1), (3).



Obr. 1 Kónické vialky používané pro extrakce malých objemů (5).

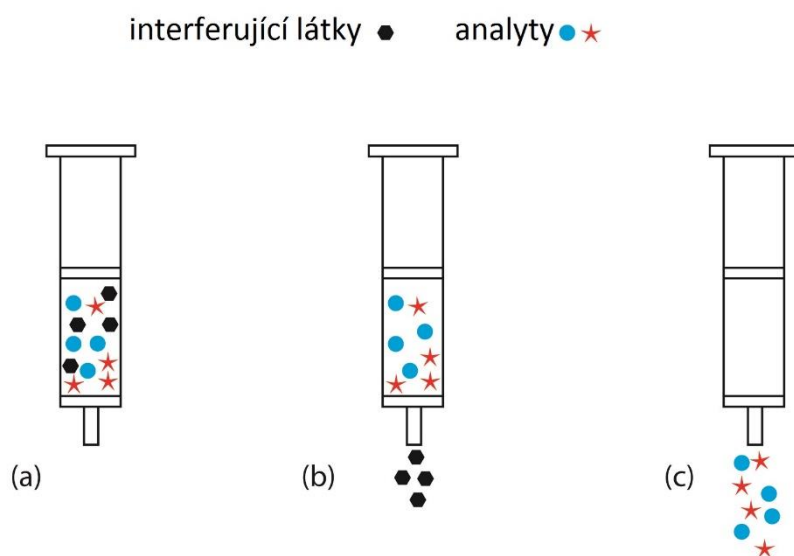


Obr. 2 Klasické provedení LLE pomocí dělicí nálevky (4).

3.1.2 Extrakce na tuhou fázi

Extrakčním principem této metody je oddělení analytu ze směsi pomocí interakcí mezi tuhou a kapalnou fází. Tuhou fází umístěnou v extrakční kolonce zde představují sorbenty obdobné jako v kapalinové chromatografii. Pro každý analyt je třeba volit sorbent s ohledem na chemické vlastnosti analytu. Stejně tak je důležitá volba kapalnou fází, ve které je analyt

rozpuštěn. Před separací je nutné aktivovat funkční skupiny sorbentu, nejčastěji methanolem. Dalším krokem je vytvoření rovnováhy na fázovém rozhraní pomocí rozpouštědla, které bude použito i pro vzorek. Během extrakce je analyt zachycen sorbentem, na kterém dochází k zakoncentrování analytu. Při optimálně zvolené soustavě – sorbent/kapalná fáze, projdou ostatní látky obsažené ve vzorku kolonkou bez adsorpce. Analyt lze z kolonky vymýt za použití malého objemu roztoku. Nevýhodou extrakce na tuhé fázi (SPE) je vysoká spotřeba vzorků a rozpouštědel, vysoký počet operací, které je nutné absolvovat a s tím spojená časová náročnost (6), (3).



Obr. 3 Průběh extrakce na tuhé fázi. (a) nanesení vzorku, (b) odstranění interferujících látek promytím kolonky, (c) vymytí analytů (7).

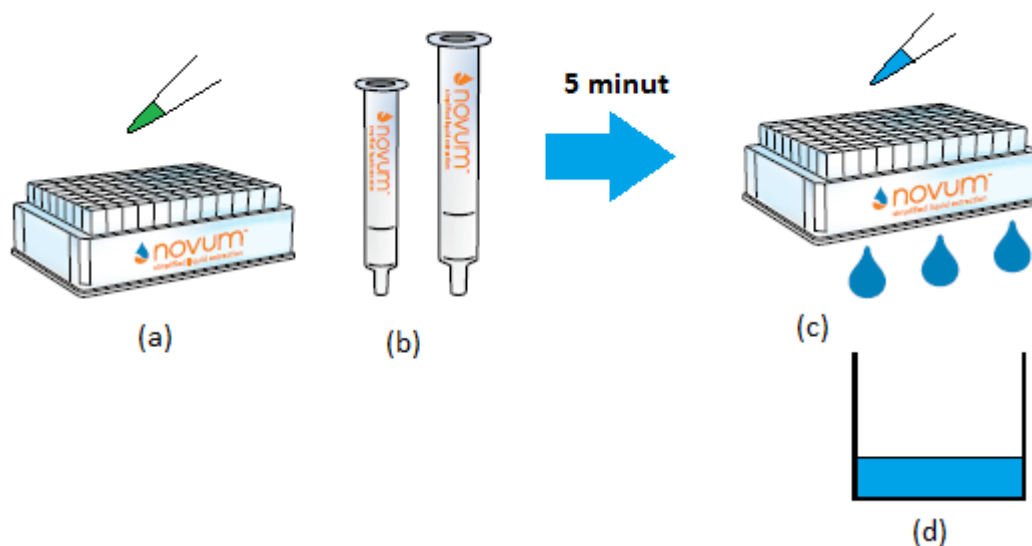
4 Podporovaná kapalinová extrakce

Jedná se o relativně novou metodu přípravy vzorků, jejímž cílem je urychlení přípravy vzorku před vlastní analýzou, snížení objemů vzorku a organického elučního činidla a automatizace celého procesu. Podnětem k vyvinutí nové metody byly nevýhody spojené s klasickou LLE.

Na konci roku 1997 Johnson a jeho spolupracovníci poprvé uvedli použití extrakční metody nazvané SLE (podporovaná extrakce z kapaliny do kapaliny), kterou testovali pro široké spektrum organických látek (8).

4.1 Princip metody

Princip tohoto typu extrakce je založen na použití křemeliny jakožto sorbentu. Křemelina poskytuje pevnou fázi, na které dochází k provedení extrakce stanovovaného analytu od ostatních látek v původním vzorku. Tato pevná fáze je umístěna v plastové kolonce, která je na spodním konci uzpůsobena k odtékání analytu.



Obr. 4 Schéma podporované kapalinové extrakce, porovnání, viz obrázek v příloze. (a) nanesení vzorku do 96-jamkové destičky, (b) nanesení vzorku na jednotlivé extrakční kolonky, (c) vymytí analytu elučním roztokem, (d) sběrná nádobka.

Vodný roztok vzorku se stanovovaným analytem je nanesen na sorbent. Ten díky své pórovitosti tvoří velký užitečný povrch, na kterém dochází k absorpci. Křemelina se chová jako houba a distribuuje vzorek po celém povrchu křemeliny v extrakční kolonce (9).

Po absorpci celého objemu vzorku do křemeliny jsou stanovované analyty vymyty (eluovány) za použití s vodou nemísitelných organických rozpouštědel jako je například ethylacetát (EtOAc), methyltercbutylether (MTBE) nebo dichlormethan (DCM). Na sorbentu dochází ke vzájemnému působení mezi zvoleným rozpouštědlem a původním roztokem vzorku. Tyto interakce umožňují stanovovaným analytům přejít do organického rozpouštědla, které není na extrakční kolonce zadržováno. Organické rozpouštědlo s obsaženým analytem je z pevné fáze vymýváno pomocí gravitace nebo pumpy pro urychlení celého procesu. Dále je po průchodu kolonkou vychytáváno do vhodné sběrací nádoby a podrobena analýze. Ostatní složky původní matrice zůstávají uchycené v pevné fázi (9), (10).

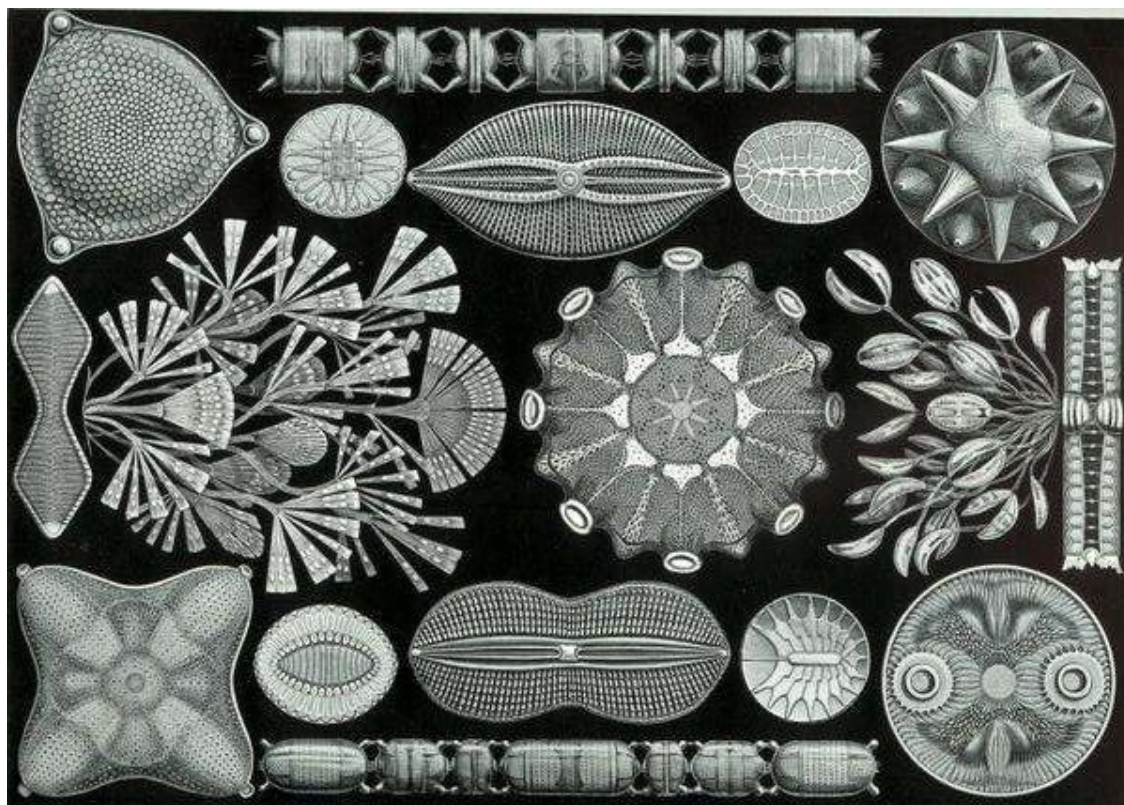
Výhodou metody SLE v porovnání s LLE je, že tento způsob separace snižuje riziko vzniku emulze a také potřebu ručně separovat obě kapalné fáze. Tím lze zabránit zbytečným ztrátám analytu, které vedou ke zkreslení výsledku následné analýzy. Na rozdíl od SPE má metoda SLE snížený počet kroků nutných pro úspěšnou separaci. Další výhodou je jednoduchost separačního procesu vyžadujícího minimální přístrojové vybavení. Taktéž je tato metoda snadno automatizovatelná, což poskytuje další časovou úsporu v přípravě vzorku (9), (10), (11).

4.2 Křemelina

Hlavní podíl křemeliny tvoří zkamenělé schránky (frustuly) jednobuněčných eukaryontních řas - rozsivek. Schránky rozsivek se chemicky skládají z polymerizovaného oxidu křemičitého (s vodou). Jako křemelinu (diatomit) označujeme horninu, která se skládá ze schránek těchto řas a příměsí jako jsou jíl a silt (prach). Předností tohoto materiálu je vysoká absorpční schopnost, která je dána vysokou porozitou materiálu, další výhodou je její chemická netečnost a tepelná nevodivost. Křemelina je schopná absorbovat až 3,5 krát více vody než sama váží (12).

Jakožto přírodní materiál se křemelina těží v dolech po celém světě. Jednotlivá naleziště jsou však zdrojem horniny s odlišnými vlastnostmi, jako jsou například odchylky ve složení, různá hustota horniny nebo kapacita vodného roztoku, který je křemelina schopná absorbovat. Proto nelze za použití přírodního materiálu zajistit stejné plnění extrakčních kolon a tedy ani

stejně podmínky analýzy. Aby bylo možné předejít nesrovnalostem při použití přírodní křemeliny, byl vyvinut a testován syntetický sorbent (9), (11)..



Obr. 5 Schránky rozsivek tvořících křemelinu (13)

4.3 Dostupnost na trhu

Několik společností se již věnuje vývoji produktů, které usnadňují přípravu vzorku pro jeho další zpracování. Následující tabulka ukazuje, jaké základní typy produktů pro SLE jsou na trhu dostupné.

Jedná se o tzv. cartridges (kazety) – někdy uváděné také jako jednotlivé kolonky či zkumavky, které jsou dostupné v různých velikostech z pohledu maximálního použitelného objemu vzorku a doporučeného objemu elučního činidla.

Dále jsou dostupné 96-jamkové destičky, které jsou vhodné pro automatizaci metody. Taktéž jsou rozdělené podle totožných parametrů jako kazety. Lze tak připravit až 96 různých vzorků současně.

Případně je možné zakoupit jen určité množství sorbentu pro přípravu vlastních extrakčních pomůcek (14).

Tabulka 2 Dostupné produkty pro aplikaci SLE, inspirováno (14)

Společnost	Kazety	96-jamkové destičky	Samotný sorbent
Agilent Technologies (15)	Chem Elut	Combilute	Hydromatrix
Angela Technologies (16)	Cleanert	Cleanert	-
Biotage (17)	ISOLUTE SLE+	ISOLUTE SLE+	ISOLUTE SLE+
Interchim (18)	Clean Elut Chem Elut	Hypersep	-
Macherey-Nagel (19)	Chromabond XTR	Chromabond multi 96 XTR	-
Orochem Technologies (20)	Aquamatrix	Aquamatrix	-
Phenomenex (21)	Novum	Novum	-
Thermo Fisher Scientific (22)	HyperSep	HyperSep	-
United Chemical Technologies (23)	-	-	Enviro Clean sorbents Electrasorb

4.4 Vysolovací podporovaná kapalinová extrakce

Vysolovací podporovaná kapalinová extrakce (SOSLE) je modifikací výše uvedené SLE metody. Technika SOSLE byla vyvinuta při snaze extrahovat a analyzovat zbytky veterinárních léčiv (antibiotik) se širokým rozmezím polarity, jež byly přítomné v kravském mléku.

Problémem původní SLE metody byla nedostatečná návratnost některých polárních analytů. To bylo způsobené tím, že vodná fáze obsahující rozpuštěný analyt neposkytovala extrakci zcela kvantitativně. SOSLE řeší tuto nevýhodu přidáním acetonitrilu do vodné fáze, čímž je zajištěna téměř kvantitativní extrakce jinak špatně extrahovatelných analytů.

Metodou SOSLE byly například z kravského mléka extrahovány a následně stanovovány benzimidazoly, chinolony, makrolidy, nitroimidazoly, peniciliny, cefalosporiny a další látky, které se neřadí ke konkrétní lékové rodině (24).

4.4.1 Provedení extrakce

Směs vodného roztoku vzorku a acetonitrilu je centrifugována, poté je do směsi přidán síran amonný, který vyvolává oddělení vodné a organické fáze (acetonitril). Následně je vodná fáze nanášena na SLE kazetu, kde dojde k ustanovení rovnováhy. Jako eluční činidlo byl použitý acetonitril, který byl předtím oddělený od vodné fáze a další množství nového acetonitrilu. Vzniklý eluát je sbírán do vialky, odpařován a připraven k další analýze.

4.4.2 Výhody použití acetonitrilu

Výhod při použití acetonitrilu ve směsi s vodou je hned několik. Acetonitril je mísitelný s vodou v libovolném poměru a je to chemicky inertní rozpouštědlo. Na druhou stranu, v čistém acetonitrilu jsou velmi polární sloučeniny špatně rozpustné. Proto byla testována směs těchto dvou látek, aby výsledná extrakční metoda poskytovala významně vyšší extrakční účinnost. Je třeba správně uvážit poměr obou složek, neboť voda přítomná ve vzorku ovlivňuje sílu rozpustnosti použitého extrakčního činidla.

4.4.3 Volba vhodné soli

Přidáním anorganické soli do směsi acetonitril-voda docílíme oddělení obou fází. Množství a druh přidané soli ovlivňuje koncentraci vody v organické fázi a acetonitrilu ve vodné fázi. Přítomnost vody v acetonitrilové fázi má zásadní význam pro extrakci polárních sloučenin. Ze zkoumaných anorganických solí se nejlépe osvědčil síran amonný, protože netvořil komplexy se stanovovanými analyty a s vysokou účinností srážel proteiny.

4.4.4 Vyhodnocení

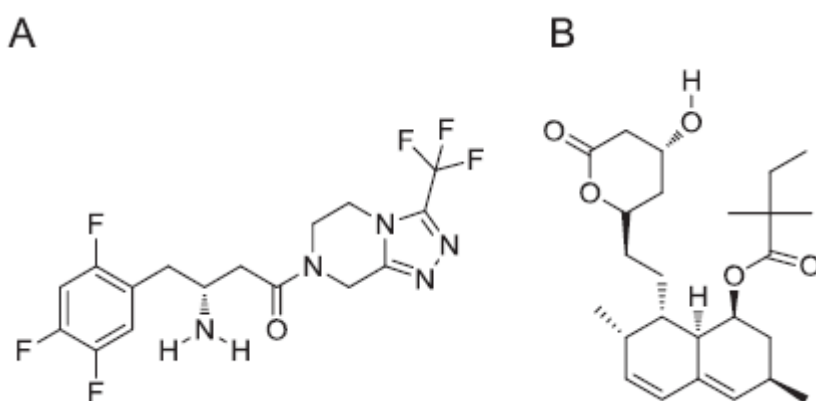
Ve výsledku byla SOSLE porovnávána s dalšími metodami – ultrafiltrací, SPE a QuEChERS. Z tohoto porovnání vykazovala SOSLE nejlepší celkový výkon, relativně nízké náklady na spotřební materiál a nejširší okruh sloučenin, které mohou být stanoveny najednou v jednom vzorku. Taktéž prokázala vyšší výtěžnost polárních a amfoterních látek (peniciliny, tetracykliny, chinolony). Na druhou stranu je SOSLE poměrně časově náročná metoda a vyžaduje zapojení lidské síly ve stejné nebo o něco menší míře než ultrafiltrace nebo SPE (24).

5 Porovnání extrakčních metod

Metody přípravy vzorku jsou neustále vyvíjeny a zdokonalovány. Přísně sledovanými parametry jsou: návratnost analytu (recovery), spotřebovaný objem organického rozpouštědla, čas potřebný k provedení a možnost automatizace metody. Proto byly provedeny experimenty a studie zaměřené na porovnání současně používaných metod a SLE. V následujících podkapitolách bude uvedeno několik z nich.

5.1 Stanovení sitagliptinu a simvastatinu

V tomto experimentu se jednalo o extrakci sitagliptinu a simvastatinu z plazmy pokusných krys. Tyto dvě účinné látky jsou součástí medikace u pacientů trpících cukrovkou 2. typu a obě látky jsou obsaženy v jedné tabletě. Proto bylo nutné vytvořit bioanalytickou metodu, která by umožnila stanovení obou látek v plazmě současně (25). Tato metoda byla vyvinuta a validována. Vzorek byl upraven za použití LLE, extrahované látky byly detekovány pomocí LC-MS/MS a celkový čas analýzy pomocí HPLC jednoho vzorku dosáhl hodnoty 3,0 minut (26). Při použití techniky SLE následovanou detekcí pomocí LC-ESI-MS/MS bylo dosaženo retenčních časů na HPLC kratších než 2 minuty na analýzu jednoho vzorku z krysí plazmy (25).



Obr. 6 (A) chemická struktura sitagliptinu, (B) chemická struktura simvastatinu (25).

Příprava vzorků

Na výběru vhodné metody přípravy vzorků závisí i úspěch celé analýzy, proto je důležité tomuto kroku věnovat náležitou pozornost. Matrice vzorku, zde plazma pokusného zvířete,

obsahuje sloučeniny způsobující nežádoucí interference, které je nutno při přípravě vzorku minimalizovat.

Příprava vzorku metodou LLE probíhala následovně. K analyzované plazmě byl přidán vnitřní standard (hydrochlorid venlaflaxinu), octan amonný, který pufruje v oblasti pH $4,5 \pm 0,05$ a organické rozpouštědlo obsahující MTBE a *n*-hexan (70:30 v/v). Po centrifugaci byla organická vrstva přenesena do zkumavky a odpařena proudem dusíku o teplotě 40°C. Vysušený extrakt byl rozpuštěn v mobilní fázi (směs acetonitrilu a octanu amonného) a zaveden do chromatografického systému.

Metoda SPE zahrnovala kromě totožného množství plazmy a vnitřního standardu navíc 500 µl vody. Tato směs byla nanášena na separační kolonku StrataX, která byla dříve promyta roztokem 20% methanolu ve vodě. Analyty a vnitřní standard byly následně vymyty mobilní fází a připraveny k analýze.

Základem separace vzorku pomocí SLE byla taktéž směs plazmy, vnitřního standardu a pufru, která byla nanášena na separační kolonku Isolute SLE+ (Biotage). Za použití mírného přetlaku byl vzorek absorbován pevnou fází v extrakční kolonce. Po pěti minutách byl na kolonku nanášen 1 ml rozpouštědla, analyty spolu s vnitřním standardem byly eluovány do zkumavky. Zde došlo k odpaření rozpouštědla proudem dusíku o teplotě 40°C. Extrakt byl znovu rozpuštěn v roztoku methanolu a připraven pro chromatografickou analýzu (25).

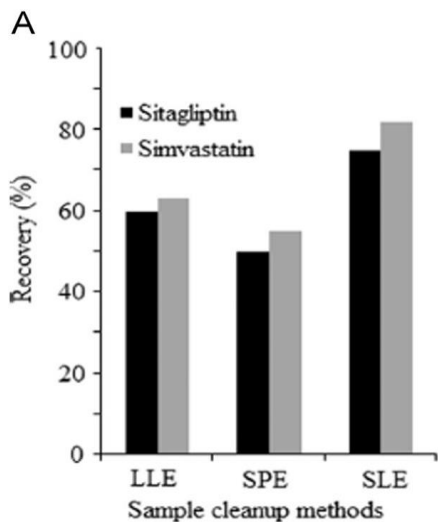
Následující tabulka shrnuje přípravu vzorků včetně použitých objemů.

Tabulka 3 Souhrn přípravy vzorků pro metodu LLE, SPE a SLE (25)

	LLE	SPE	SLE
Objem plazmy	200 µl	200 µl	200 µl
Vnitřní standard	50 µl	50 µl	50 µl
Pufr (octan amonný)	100 ml	-	300 µl
Rozpouštědlo	4 ml MTBE + <i>n</i> -hexan	2 ml mobilní fáze	1 ml MTBE + <i>n</i> -hexan
Rekonstituční roztok	250 µl mobilní fáze	-	400 µl methanolu
Použité kolonky	Nepoužívají se	StrataX 33 µm polymeric sorbent	Isolute SLE+
Analyzovaný objem	20 µl	20 µl	20 µl

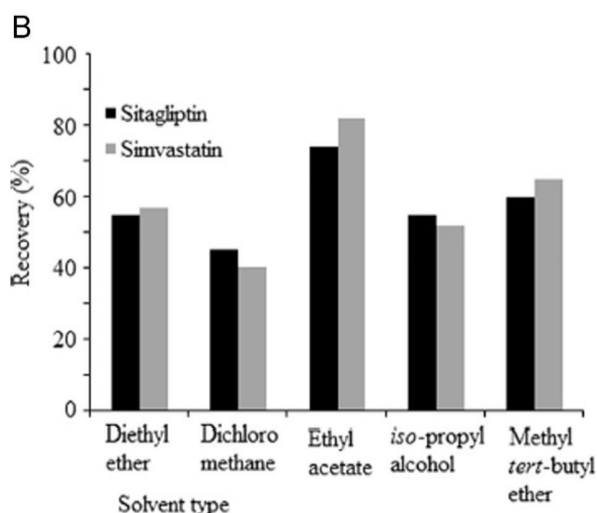
Vyhodnocení

Z níže uvedeného obrázku je patrné, že technika SLE poskytuje z porovnávaných metod nejvyšší extrakční účinnost (nejvyšší návratnost analytu).



Obr. 7 Porovnání extrakčních metod (25)

Během experimentu se hodnotily následující parametry: vhodné extrakční rozpouštědlo, návratnost analytů po odpaření proudem dusíku a znovu rozpuštění vzorků a extrahovatelný objem. Pro eluci analytu byla studována různá organická rozpouštědla – EtOAc, MTBE, DCM a iIPA, z nichž EtOAc prokázal nejvyšší návratnost (viz Obr. 8). K získání nejvyšší návratnosti analytu po odpaření a rekonstituci je nejvýhodnější roztok sestávající z 90% methanolu ve vodě. Také byly studovány různá množství plazmy a rozpouštědla. Optimálně se projevila kombinace 200 μ l plazmy a 400 μ l rozpouštědla (25), (26).



Obr. 8 Porovnání rozpouštědel pro metodu SLE (25)

5.2 Stanovení β -blokátorů a nesteroidních antiflogistik

Následující experiment se zabýval porovnáním účinností metod LLE a SLE, a to na příkladech extrakcí β -blokátorů, jakožto bazických analytů a nesteroidních antiflogistik (NSAIDs), které zde zastupují kyselé analyty. Byla porovnáována návratnost analytů a prokázány totožné limity kvantifikace s menším objemem vzorku při použití metody SLE.

Příprava vzorků

Přípravu vzorků pro metodu SLE popisuje následující tabulka.

Tabulka 4 Příprava vzorků pro metodu SLE (27).

	Objem plazmy	Objem a druh přidaných látek	Poměr složek
NSAIDs	200 μ l	200 μ l 1% kyseliny mravenčí	1:1
B-blokátory	200 μ l	200 μ l 0,5M hydroxidu amonného	1:1

Celkový objem extrahovaného vzorku (400 μ l) byl nanesen na extrakční destičku ISOLUTE SLE+ 400 (Biotage) a za pomoci pulzu vakua byl vzorek absorbován. Následné vymytí analytů bylo uskutečněno dvakrát 900 μ l rozpouštědla. Volba vhodného rozpouštědla závisí na analytu, který má být z kolony eluován. Pro vymytí β -blokátorů byl použit EtOAc a pro eluci NSAIDs byl vybrán MTBE.

Příprava vzorků pro použití techniky LLE byla popsána v následující tabulce.

Tabulka 5 Příprava vzorků pro LLE (27)..

	Celkový objem vzorku	Složení vzorku	Poměr složek	Organická fáze
NSAIDs	500 μ l	Plazma + 1% kyselina mravenčí	1:1	MTBE
B-blokátory	500 μ l	Plazma + 0,5M hydroxid amonný	1:1	EtOAc

Organická fáze s extrahovaným analytem byla odpařena do sucha a následně byl stanovovaný analyt rozpuštěn ve vodném roztoku methanolu (500 μ l).

Všechny extrakty byly analyzovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (HPLC-MS).

Vyhodnocení

Závěry ukazují, že příprava vzorků provedená pomocí ISOLUTE SLE+ poskytovala vyšší návratnost analytů a prokázala lepší odezvu signálu než vzorky připravené metodou LLE. Metodou SLE za použití ISOLUTE SLE+ lze analyzovat nižší objemy vzorku, neboť limity kvantifikace byly ve srovnání s LLE nižší (27).

5.3 Vliv podporované kapalinové extrakce na snížení vlivu matrice a zlepšení extrakční účinnosti

Cílem této studie bylo systematické hodnocení metody SLE za různých extrakčních podmínek s ohledem na dvě kritéria. Prvním kritériem byla redukce efektu způsobeného maticí, druhé kritérium byla extrakční účinnost/návratnost analytu. Hodnocení bylo provedeno na deseti farmaceutických sloučeninách s rozsahem hodnot $\log P$ (kde P je rozdělovací koeficient) 0,1 – 6,24 a hodnotami pK_a v rozmezí 4,0 – 11,1. Jmenovitě byly stanovovány následující látky: diklofenak, progesteron, ambrisentan, karbamzepin, atenolol, metoprolol, daunorubicin, paklitaxel, celexocib. Extrahované sloučeniny byly následně analyzovány systémem LC-ESI-MS/MS.

Látky přítomné v biologické matici mohou způsobovat během analýzy nežádoucí interference. Druh interferujících látek závisí na biologickém materiálu, ve kterém je analyt stanovován. Patří sem například soli, kyselina močová, uhlovodíky, aminy, lipidy a peptidy. Hlavním zdrojem maticového efektu byly v LC-MS/MS určeny fosfolipidy, neboť právě fosfolipidy se eluují v širokém rozmezí retenčního času.

V této studii byly hodnoty zkoumaných kritérií porovnávány s hodnotami získanými metodou proteinové precipitace. Extrakční podmínky byly měněny změnou hodnoty pH a/nebo změnou typu a obsahu organického rozpouštědla v pufru či změnou složení mobilní fáze.

Příprava vzorků

Příprava vzorku pro techniku proteinové precipitace byla následující. Čistý vzorek plazmy (bez analytů), plazma obohacená analyty nebo voda o objemu 100 μ l byla smíchána s 300 μ l acetonitrilu nebo methanolu. Po centrifugaci byl supernatant přenesen do suché zkumavky a odpařen do sucha. Zbytek po vysušení byl znovu rozpuštěn ve 400 μ l směsi acetonitrilu a vody nebo ve standardním roztoku analytu ve směsi acetonitril/voda.

Vzorek pro metodu SLE byl připraven tak, že 100 μ l prázdné (blankové) plazmy, plazmy obohacené analyty nebo vody bylo naředěno 100-150 μ l ředícího roztoku. Jako ředící roztok byly testovány kyselina mravenčí, hydroxid amonný a směsi vody a acetonitrilu nebo methanolu. Tato směs byla nanesena na SLE destičku. Pro usnadnění absorpce roztoku byl použit přetlak. Po dosažení rovnováhy mezi sorbentem a vzorkem se analyty vymyjí 1 ml rozpouštědla. Jako organická rozpouštědla byly testovány: MeOH, ACN, EtOAc, MTBE, DCM:IPA (95:5, v/v) a DCM. Vzniklý eluát byl odpařen do sucha a zbytek byl znovu rozpuštěn ve 400 μ l směsi acetonitril/voda nebo ve standardním roztoku analytu ve směsi acetonitril/voda.

Vyhodnocení

Při použití optimálního pufru a elučního roztoku pro provedení SLE bylo dosaženo návratnosti 75% u všech deseti analytů. Taktéž u všech deseti látek byl efekt matrice nevýznamný, čímž bylo prokázáno, že SLE je pro odstranění fosfolipidů velmi efektivní metodou. Bylo potvrzeno, že účinné extrakce a minimálního matricového efektu u vybraných farmaceutických sloučenin může být dosaženo správnou volbou pufru a vymývacího rozpouštědla (28).

6 Aplikace podporované kapalinové extrakce

Z dostupných literárních zdrojů byla vypracována rešerše se zaměřením na nalezení informací o použití metody SLE v analýze. Při hledání byla využita hesla: „Supported liquid extraction“ a „Solid supported liquid-liquid extraction“. Při vyhledávání zdrojů v databázi Science Direct jsem našla kolem dvaceti článků, které se zabývaly přímo metodou SLE.

Tato kapitola je věnována stanovení několika vybraných látek, pro které byla vyvinuta a validována metoda podporované kapalinové extrakce. Následující látky byly nejčastěji extrahovány z plazmy pokusných zvířat a lidské plazmy. Méně často například ze slin, jiných tělních tekutin či nebiologického materiálu.

6.1 Extrakce aldosteronu

V této studii byla metoda SLE použita pro extrakci aldosteronu, který byl následně analyzován pomocí LC-MS/MS. Aldosteron je extrahován z plazmy, kde se vyskytuje v nízkých koncentracích(29). Funkcí aldosteronu je hospodaření s vodou a draselnými ionty. Místem jeho působení jsou buňky distálních tubulů ledvin a buňky sběracích kanálků. Do těchto buněk přechází z moči sodné ionty a právě zde se uplatňuje aldosteronem aktivovaná Na^+/K^+ -ATPázová pumpa, která odčerpává sodné ionty do intersticia. Ve výše zmíněných buňkách dojde ke zvýšení negativního potenciálu, který podporuje sekreci draselných a vodíkových iontů do kanálků. Z tohoto mechanismu je patrné, že se zvyšující se produkcí aldosteronu roste i zpětné vstřebávání sodných iontů, což vede ke zvýšenému zadržování tekutin, zvýšenému objemu plazmy a k získané hypertenzi. Budou-li se více vstřebávat sodné ionty, pak se ionty draselné a vodíkové budou snažit zmírnit vznikající negativní potenciál, což povede k jejich vyššímu vylučování a tím i k hypokalemii a metabolické alkalóze. Tyto stavy potom dále ovlivňují další tělní funkce (30).

Indikací pro stanovení hladiny aldosteronu je podezření lékaře na některá závažná onemocnění jako jsou primární hyperaldosteronismus (a s tím spojená sekundárně vzniklá hypertenze) či stavy a s nimi související obtíže spojené s poruchou iontové rovnováhy v organismu (31).

Rutinně se k extrakci aldosteronu používá metoda SPE. Zde byly vzorky nejprve extrahovány metodou SPE a následně na dvou typech SLE destiček – od firem Thermo a Biotage. Poté bylo provedeno porovnání všech tří separačních technik.

Příprava vzorků pro SLE

Na přípravu bylo použito 250 μ l vzorku, 10 μ l vnitřního standardu D7 aldosteronu a 150 μ l vody. Tato směs byla přenesena na SLE destičky. Jako extrakční činidlo bylo použito 900 μ l MTBE. Extrakt v MTBE byl odpařen dosucha a následně rozpuštěn v 80 μ l 35% methanolu.

Vyhodnocení

Obě extrakční destičky (Thermo, Biotage) prokázaly vynikající shodu s výsledky techniky SPE. Příprava vzorků pro SLE je méně časově náročná. Bylo zjištěno, že nejcitlivější výsledky byly získány ze vzorků extrahovaných pomocí destičky Biotage. Destička Thermo prokázala reprodukovatelnější extrakční účinnost. To mohlo být způsobeno jejím odlišným složením, které, jak deklaruje výrobce, vede k efektivnějšímu odstranění fosfolipidů. Taktéž destička Thermo byla cenově nejpříznivější ze zkoumaných technik. Celkově se metoda SLE ukázala jako rychlejší, citlivější a potenciálně levnější v porovnání s rutinně používanou SPE metodou (29).

6.2 Stanovení erlotinibu v lidské plazmě

Erlotinib je účinná látka, která je součástí léčiva Tarceva, určená pacientům s lokálně pokročilým nebo metastazujícím nemalobuněčným karcinomem plic (32).

V této studii byl erlotinib extrahován z lidské plazmy pomocí SLE a následně analyzován systémem HILIC-MS/MS. Separační technika HILIC je vhodná pro polární a hydrofilní látky (33). Díky použití této separační techniky je možné eliminovat vysoušecí a rekonstituční kroky. Pro extrakci byly použity kolony Isolute SLE+ (Biotage). Matricový efekt, extrakční účinnost a návratnost metody SLE byla porovnávána s technikami PPT a LLE.

Příprava vzorku pro SLE

Plazma o objemu 100 μ l a vnitřní standard (erlotinib-d₆) o objemu 10 μ l byly umístěny do 96-hlubokojamkové destičky. K této směsi bylo přidáno 100 μ l 10% hydroxidu amonného. Z

celkového objemu 210 µl bylo odebráno 200 µl a přeneseno do Isolute SLE+ destičky. Po absorpci analytů do křemeliny bylo použito 800 µl MTBE pro extrakci zachyceného analytu (erlotinib). Nakonec 10 µl MTBE s eluovaným analytem bylo injektováno přímo do systému HILIC-MS/MS.

Vyhodnocení

V porovnání s PPT, SLE vykazovala nižší šum základní linie na chromatogramu a vyšší celkovou účinnost extrakce. Porovnání SLE a LLE ukázalo, že celková extrakční účinnost byla vyšší v případě techniky SLE při dodržení totožných extrakčních podmínek. Podle níže uvedené tabulky lze říci, že výtěžnost SLE byla téměř 100%, což ukazuje, že tento extrakční postup je pro erlotinib vhodný (34).

Tabulka 6 Návratnost erlotinibu z plazmy (34).

Extrakční metoda	PPT			LLE			SLE		
Plazmatická koncentrace (ng/ml)	6	160	1,600	6	160	1,600	6	160	1,600
Extrakční návratnost (%)	69	73	78	89	83	79	104	97	103
Celková průměrná návratnost (%)		73,3			83,6			101,3	

6.3 Stanovení elvitegraviru a ritonaviru v krysí plazmě

Elvitegravir je jedna z látek, které se používají při léčbě pacientů infikovaných virem lidské imunodeficiency typu 1 (HIV-1). Působí jako inhibitor integrázy, což je enzym zodpovědný za integraci virového genetického materiálu do genetického materiálu infikované buňky. Tento enzym je inhibován, čímž je zpomalováno šíření infekce (35). Ritonavir je látka inhibující enzym proteázu. Proteáza v HIV je zodpovědná za štěpení polyproteinových řetězců na jednotlivé funkční proteiny. Touto inhibicí dochází k tvorbě nezralých a neinfekčních virových částic (36).

Příprava vzorků

Z křysí plazmy (0,1 ml), kalibračních standardů (0,1 ml), QC vzorků elvitegraviru a ritonaviru, vnitřního standardu (10 µl) a kyseliny mravenčí (300 µl) byla vytvořena směs, která byla nanesena na kazetu Isolute SLE+ (Biotage). Po pěti minutách, během kterých probíhala absorpce směsi na vrstvu křemeliny, bylo naneseno eluční činidlo DCM. Získaný extrakt byl odpařen dosucha a rekonstituován v mobilní fázi (1 ml). 20 µl mobilní fáze s eluátem bylo injektováno do systému LC-MS/MS a analyzováno.

Vyhodnocení

V porovnání s klasickou LLE, SLE vykazuje vyšší návratnost analytů a efektivnější odstranění fosfolipidů. V potlačení efektu matrice prokázaly obě metody podobné výsledky. Bylo prokázáno, že metoda SLE je dobrou alternativou k již používané metodě LLE (37).

6.4 Analýza návykových látek

V roce 2006 zavedla Jižní Austrálie náhodné testování řidičů na methyldamphetamin (MA) neboli pervitin, methyldioxyamfetamin (MDMA) tedy extázi a Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) (38). MA, MDMA i THC se řadí mezi látky psychotomimetické (halucinogenní), které ovlivňují vnímání a emoce jedince a navozují psychickou závislost (39).

Policisté využívají pro tyto náhodné kontroly dva druhy kitů, pomocí nichž odhalí užití výše uvedených látek ze slin řidičů. Pokud první test odhalí pozitivitu, použijí policisté druhý typ kitu pro odběr slin a vzorek posílají do laboratoří FSSA (Forensic Science South Australia), kde je analyzován. Počet vzorků od zavedení náhodného testování neustále vzrůstá a v roce 2008 bylo zavedeno i odebrání krve řidičům přítomných u dopravních nehod. Proto bylo žádoucí vyvinout účinnou a robustní analytickou metodu, která by byla schopná analyzovat tyto látky jak ve slinách, tak v krvi. Touto metodou je právě příprava vzorku pomocí SLE a následná analýza pomocí LC-MS/MS (38).

Extrakce drog z krve

Objem krve 100 µl byl naředěn 280 µl amoniaku a 20 µl roztoku vnitřního standardu. Celý objem (400 µl) byl promíchán, centrifugován a nanesen na Isolute SLE+ (Biotage) 96-jamkovou extrakční destičku. Po vytvoření rovnováhy bylo na destičku naneseno eluční

činidlo MTBE (2x 900µl do každé jamky). Eluát byl odpařen proudem dusíku dosucha a znovu rozpuštěn v methanolu (80 µl) (38).

Extrakce drog ze slin

Vzorek slin přichází do laboratoře v kitu, který je používán pro odběr a je již naředěn puřem. 100 µl z této směsi je dále naředěno 80 µl amoniaku a 20 µl vnitřního standardu. Po promíchání byla směs nanesena na Isolute SLE+ 96-jamkovou extrakční destičku. Obsah každé jamky byl eluován jedním mililitrem MTBE do skleněné vložky umístěné v každé jamce. Extrakt byl odpařen dosucha proudem dusíku a rekonstituován v 80 µl methanolu.

Bez použití skleněných vložek umístěných v jamkách extrakčních destiček byla prokázána nižší návratnost analytů. Extrakty rozpuštěné v methanolu byly analyzovány pomocí LC-MS/MS (38).

Vyhodnocení

Průměrné návratnosti analytů extrahovaných ze slin byly 81% MA, 85% MDMA a 67% THC. Průměrné návratnosti analytů extrahovaných z krve byly 105% MA, 91% MDMA a 80% THC.

Od zavedení náhodných kontrol a odebrání krve řidičům přítomných u autonehod se pořadí užívaných drog nezměnilo - MA se vyskytuje nejčastěji, THC méně často, MDMA nejméně často. V Jižní Austrálii roste počet řidičů, u kterých je stanoveno MA zároveň s THC. THC je nejčastěji analyzováno z krve, což může být způsobeno přetrváváním hladiny THC v krvi chronických uživatelů marihuany. Podíl řidičů, u kterých je stanovena hladina MA, se od začátku kontrol (2006) ztrojnásobil, což se shoduje s tzv. „Ice¹ epidemiemi“, které jsou v posledních letech v Austrálii pozorovány (38).

6.5 Použití v kosmetickém průmyslu

Nedílnou součástí řady kosmetických přípravků - krémů, tělových mlék, mýdel, ale hlavně parfémů, jsou látky zajišťující dlouhotrvající a silnou vůni. Pižma, jak jsou tyto látky označovány, jsou získávána ze žláz kabara pižmového (*Moschus moschiferus*) (40). Kabar pižmový patří mezi ohrožené druhy, protože dříve bylo nutné pro získání pižma vyjmout celou žlázu a zvíře usmrtit. Dnes se kabarové pěstují na farmách a pižmo je získáváno tak,

¹ Ice je slangové označení používané pro methyldamfetamin.

aby nebyli ohroženi na životě. Přesto je toto „pravé“ pižmo stále velmi drahou a vzácnou ingrediencí (41).

Dnes se do většiny kosmetických přípravků používají pižma syntetická. Rozlišují se tři skupiny v závislosti na jejich chemické struktuře. Jsou to pižma polycyklická (tonalid, phantolid), nitroaromatická (ambrette, tibeten, keton, xylen) a makrocyklická. Polycyklická a nitroaromatická pižma začala být hojně používána a začaly se objevovat studie poukazující na závadnost (hlavně) xylenového pižma vzhledem k lidskému zdraví a životnímu prostředí (40), (42). Bylo například zjištěno, že syntetická pižma mohou vést ke vzniku dermatitid, karcinogenezi nebo endokrinním poruchám. Proto začalo být použití těchto syntetických náhražek regulováno, některé z nich byly zakázány (42).

Většina současných analytických metod je přizpůsobena pro analýzu vzorků, jako je voda, odpadní vody, kal, sediment, vzduch. Již jsou dostupné metody pro identifikaci a stanovení těchto látek v parfémeh a emulzích. Následující studie byla zaměřena na vyvinutí metody, pomocí níž by syntetická pižma bylo možné stanovovat ze složitější matrice – krému, který kromě hydrofilních látek obsahuje i látky lipofilní. Následná analýza extrahovaných analytů byla provedena pomocí systému GC-MS/MS (42).

Příprava vzorků

Bylo naváženo 0,5g krému a odměřeno 150 µl vnitřního standardu (D15-Musk Xylene, D3-Tonalid). K této směsi bylo do zkumavky přidáno 8 ml extrakčního roztoku složeného z vody a isopropanolu (IPA) (1:2). Extrakce probíhala za použití ultrazvuku (po dobu 5 minut), vytřepáváním (5 minut) a centrifugací (15 minut). Vrchní vrstva extrakčního roztoku (4 ml) byla poté čištěna kolonkami (2x SLE a 2x LC-Alumina-N SPE). SPE kolonky byly promyty 5 ml acetonu a aktivovány 5 ml IPA, SLE kolonky nevyžadují žádnou přípravu před nanesením vzorku. 4 ml extrakčního roztoku s analyty bylo naneseno na SLE kolonky, kde došlo k absorpci vodné části vzorku. Poté byly kolonky promyty pěti porcemi DCM (4 ml), které byly sbírány. Výsledný objem byl odpařen proudem dusíku. Zbytek po odpaření byl znovu rozpuštěn v 0,5 ml isooktanu a filtrován přes PTFE filtr. Následovala analýza GC-MS/MS (42).

Následně byla tato metoda použita pro stanovení syntetických pižmových náhražek ve 4 dětských a 24 obyčejných krémech, které byly zakoupeny v pekingských obchodech. Bylo prokázáno, že v tomto případě voda může zlepšit účinnost separace. Vybrané vnitřní standardy byly účinné pro odstranění matricového efektu. Tento způsob extrakce v kombinaci

s GC-MS/MS se jeví jako přesný a použitelný pro rutinní analýzu vybraných sedmi syntetických pižmových náhražek (42).

6.6 Analýza polyfenolů ve víně

V plodech vinné révy (*Vitis vinifera*) se nachází řada polyfenolických látek. V průběhu kvašení jsou tyto sloučeniny převedeny do vína, kde jsou částečně zodpovědné za charakteristické vlastnosti (barva, aroma, chuť) a mají antibakteriální účinky. Některým fenolickým látkám jsou připisovány vlastnosti prospěšné lidskému zdraví (43). Například resveratrol, patřící mezi stilbeny, je látka s fungicidním a antioxidačním účinkem, zpomalující degeneraci mozkové kůry, v krvi snižuje hladinu LDL atd. Flavonoidy jsou také důležitou součástí antioxidačního systému (44), (45).

V posledních letech se objevuje snaha nahradit dosavadní techniky technikami rychlejšími a s použitím menších množství organických rozpouštědel, s vyššími hodnotami návratností a nižším limitem detekce. Takovou metodou je například solid supported liquid-liquid extraction (SS-LLE). V následující studii byly extrahované polyfenoly analyzovány pomocí HPLC-DAD. Také byly porovnávány komerčně dostupné kazety naplněné sorbentem a laboratorně připravené kazety (43).

Příprava vzorků pro komerčně vyrobené kazety (XTR Chromabond)

Víno (10 ml) okyselené kyselinou chlorovodíkovou bylo nanášeno do kazety, po 15 minutách absorpce bylo do kazety aplikováno 24 ml elučního činidla (EtOAc). Eluát byl sbírán, odpařen dosucha proudem dusíku a reziduum bylo znovu rozpuštěno ve 2 ml směsi methanol/voda. Před vlastní analýzou byl vzorek přefiltrován přes PTFE filtr, poté byl nanášen do HPLC-DAD systému (43).

Příprava vzorků pro laboratorně připravené kazety

Okyselené víno (5 ml) bylo smíšeno se 6 g křemelinového prášku. Směs se kvantitativně převedla do skleněné stříkačky s na dně vyloženými fritami z filtračního papíru. Směs se pístem injekční stříkačky slisovala a pokryla se dalšími fritami z filtračního papíru. Extrahované sloučeniny byly eluovány 18 ml EtOAc. Extrakt byl odpařen dusíkem a znovu rozpuštěn v 1 ml směsi methanolu s vodou. Dále byl vzorek před analýzou opět přefiltrován (43).

Vyhodnocení

V porovnání s LLE, SS-LLE prokázala vyšší extrakční účinnost pro většinu sledovaných sloučenin kromě flavonolů. Co se spotřeby organických činidel týká, pro většinu sledovaných sloučenin byly výtěžky maximalizovány při použití 15ml EtOAc. Doba analýzy byla pro obě zkoumané metody shodná, protože u vlastnoručně vyrobené kazety nebylo nutné čekat 15 minut, než se nanesený vzorek absorbuje. Nicméně, extrakce pomocí vlastnoručně připravené kazety je náročnější na laboratorní práci a není automatizovatelná. Na druhou stranu, u některých látek poskytla metody využívající vlastnoručně připravené kazety lepší výsledky (43).

7 Závěr

Extrakční postupy jsou důležitou součástí analýzy vzorku. Díky těmto metodám lze od původní směsi oddělit stanovovanou látku, zakonzentrovat ji v menším objemu a tím zvýšit citlivost jejího následného stanovení, nejčastěji pomocí systému HPLC-MS. Z extrakčních metod jsou dnes nejvíce používané metody extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) a extrakce na tuhou fázi (SPE).

Modifikací LLE vznikla metoda podporované kapalinové extrakce (SLE). V principu se stále jedná o extrakci z kapaliny do kapaliny, avšak s tím rozdílem, že původní kapalina je ukotvena na křemelinovém sorbentu. Po absorpci je na křemelinový sorbent aplikováno eluční činidlo, do kterého přechází extrahované analyty. Extrakce tak probíhá na velmi tenké vrstvě kapaliny, tím je zabráněno vzniku emulze. Zvolené eluční činidlo obsahující analyt je sbíráno do vhodné nádoby a dále upravováno pro analýzu či rovnou analyzováno. Metoda SLE je na rozdíl od metody LLE snadno automatizovatelná, časově méně náročná a vykazuje menší spotřebu organických rozpouštědel.

Již byly vyvinuty a validovány metody pro extrakci celé řady látek pomocí SLE, avšak rutinního použití se tato metoda zatím nedočkala.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 Kónické vialky používané pro extrakce malých objemů (5).....	- 12 -
Obr. 2 Klasické provedení LLE pomocí dělicí nálevky (4).....	- 12 -
Obr. 3 Průběh extrakce na tuhé fázi. (a) nanesení vzorku, (b) odstranění interferujících látek promytím kolonky, (c) vymytí analytů (7).	- 13 -
Obr. 4 Schéma podporované kapalinové extrakce, porovnání, viz obrázek v příloze. (a) nanesení vzorku, (b) jednotlivé extrakční kolonky, (c) vymytí analytu elučním roztokem, (d) sběrná nádobka.	- 14 -
Obr. 5 Schránky rozsivek tvořících křemelinu (13)	- 16 -
Obr. 6 (A) chemická struktura sitagliptinu, (B) chemická struktura simvastatinu (25).	- 19 -
Obr. 7 Porovnání extrakčních metod (25)	- 21 -
Obr. 8 Porovnání rozpouštědel pro metodu SLE (25)	- 21 -
Obr. 9 Původní schéma podporované kapalinové extrakce, převzato z (21).....	- 40 -

8 Bibliografie

1. **Karlíček, R., a další.** *Analytická chemie pro farmaceuty*. Praha : Karolinum, 2009. stránky 265-266. 978-80-246-1453-3.
2. **Klouda, P.** *Moderní analytické metody*. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. stránky 9, 43-45. 978-80-86369-07-5.
3. **Nováková, L. a Douša, M.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha : Europrint a.s., 2013. stránky 107-110. 978-80-260-4244-0.
4. **www.thevespiary.org. Organic Chemistry Teaching Laboratory.** [Online] [Citace: 03. 04. 2016.] https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/chemistry/extraction_theory.html.
5. **www.wilmad-labglass.com. Wilmad-LabGlass.** [Online] [Citace: 03. 04. 2016.] <https://www.wilmad-labglass.com/ProductList.aspx?t=195>.
6. [Online] [Citace: 9. 02. 2016.] http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/spf_fe.pdf.
7. **SOCRATIC.** [Online] 2014. [Citace: 03. 04. 2016.] <http://socratic.org/questions/how-does-solid-phase-extraction-differ-from-solvent-extraction>.
8. **Breitenbucher, J. G., Arienti, K. L. a McClure, K. J.** Scope and Limitations of Solid-Supported Liquid-Liquid Extraction for the High-Throughput Purification of Compound Libraries. *Journal of Combinatorial Chemistry*. 2001, Sv. 3(6), stránky 528-33.
9. **Pike, E.** Simplifying Liquid Extractions. *The Column*. 2015, Sv. 11 (3), stránky 17-21.
10. —. A Timesaving Approach to Sample Preparation. *Food Quality and Safety*. [Online] 2015. [Citace: 9. 2 2016.] <http://www.foodqualityandsafety.com/article/a-timesaving-approach-to-sample-prep/>.
11. —. A Simplified Approach to Bioanalytical Sample Preparation. [Online] 2015. [Citace: 9. 2. 2016.] <http://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/172516-A-Simplified-Approach-to-Bioanalytical-Sample-Preparation/>.

12. Kaštovský, J. a Hauer, T. *Sinicearasy.cz*. [Online] [Citace: 9. 2 2016.] <http://www.sinicearasy.cz/134/Bacillariophyceae>.
13. Mihulka, S. *www.osel.cz. Objective Source E-Learning*. [Online] [Citace: 03. 04. 2016.] <http://www.osel.cz/2578-kremikove-soucastky-ze-schranek-rozsivek.html>.
14. Majors, R. E. Supported Liquid Extraction: The Best-Kept Secret in Sample Preparation. *LCGC Europe*. 2012, Sv. 25(8).
15. *www.agilent.com. Agilent Technologies*. [Online] [Citace: 12. 03 2016.] <http://www.agilent.com/en-us/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/supported-liquid-extraction#2>.
16. *www.bonnaagela.com. Agela Technologies*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://www.bonnaagela.com/search?type=Product&keywords=SLE&group=0>.
17. *www.biotage.com. Biotage*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://www.biotage.com/product-page/isolute-sle-supported-liquid-extraction-products>.
18. *www.interchim.eu. Interchim*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://www.interchim.eu/catalogue/113/lle-sle.html>.
19. *www.mn-net.com. Macherey-Nagel*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://www.mn-net.com/SPEStart/SPEphases/SPEspecialphases/CHROMABONDXTTR/tabid/4298/language/en-US/Default.aspx>.
20. *www.orochem.com. Orochem*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] http://www.orochem.com/index.php?route=information/information&information_id=15&path=1_9.
21. *www.phenomenex.com. Phenomenex*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://www.phenomenex.com/Products/Detail/Novum>.
22. *www.thermofisher.com. Thermo Fisher Scientific*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/60109-200-2-7W?ICID=search-product>.

23. www.unitedchem.com. *UCT*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <https://www.unitedchem.com/catalog/sample-prep/bulk-sorbents/enviro-clean-sorbents>.
24. Kaufmann, A., a další. Multi-residue quantification of veterinary drugs in milk with a novel extraction and cleanup technique: Salting out supported liquid extraction (SOSLE). *Analytica Chimica Acta*. 2014, Sv. 820, stránky 56-68.
25. Ramesh, B., a další. Comparison of conventional and supported liquid extraction methods for the determination of sitagliptin and simvastatin in rat plazma by LC-ESI-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2015, Sv. 5 (3), stránky 161-168.
26. Burugula, L., a další. Simultaneous determination of sitagliptin and simvastatin in human plasma by LC-MS/MS and its application to a human pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 2012, Sv. 27(1), stránky 80-87.
27. Caulfield, J., a další. [chromatographyonline.com](http://www.chromatographyonline.com). *LCGC*. [Online] [Citace: 18. 02. 2016.] <http://www.chromatographyonline.com/comparison-liquid-liquid-extraction-ll-and-supported-liquid-extraction-sle-equivalent-limits-quant>.
28. Jiang, H., a další. Systematic evaluation of supported liquid extraction in reducing matrix effect and improving extraction efficiency in LC-MS/MS based bioanalysis for 10 model pharmaceutical compounds. *Journal of Chromatography B*. 2012, Sv. 891-892, stránky 71-80.
29. Owen, L. J. a Keevil, B. G. Supported liquid extraction as an alternative to solid phase extraction for LC-MS/MS aldosterone analysis? *Annals of Clinical Biochemistry*. [Online] [Citace: 12. 03. 2016.] <http://acb.sagepub.com/content/early/2013/07/29/0004563213480758.abstract>.
30. Fölsch, U. R., Kochsiek, K. a Schmidt, R. F. *Patologická fyziologie*. Praha : Grada Publishing, 2003. str. 408. 80-247-0319-X.
31. Matějka, P. a Čecháček, Z. www.cechacek-sro.cz. [Online] [Citace: 03. 04. 2016.] <http://www.cechacek-sro.cz/news/stanoveni-aldosteronu/>.
32. [Online] [Citace: 19. 03. 2016.] http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2005/200509199999/anx_9999_cs.pdf.

33. *Hydrofilní interakční chromatografie*. [Online] [Citace: 19. 03. 2016.] <http://www.hplc.cz/Teorie%5Chilic.html>.

34. Pan, J., Jiang, X. a Chen, Y. Automatic Supported Liquid Extraction (SLE) Coupled with HILIC-MS/MS: An Application to Method Development and Validation of Erlotinib in Human Plasma. *Pharmaceutics*. 2010, Sv. 2(2), stránky 105-118.

35. *European Medicines Agency*. [Online] [Citace: 20. 03. 2016.] http://www.ema.europa.eu/docs/cs_CZ/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/004042/WC500197864.pdf.

36. pubchem.ncbi.nlm.nih.gov. *Pubchem*. [Online] [Citace: 20. 03. 2016.] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/ritonavir#section=Top>.

37. R., Nageswara Rao, a další. Diatomaceous earth supported liquid extraction and LC-MS/MS determination of elvitegravir and ritonavir in rat plasma: application to a pharmacokinetic study. *Anal. Methods*. 2013, Sv. 5, stránky 6693-6699.

38. Rositano, J., a další. Supported liquid extraction (SLE) for the analysis of methylamphetamine, methylenedioxymethylamphetamine and delta-9-tetrahydrocannabinol in oral fluid and blood of drivers. *Forensic Science International*. 2016, Sv. 265, stránky 125-130.

39. Patočka, J. *Vojenská toxikologie*. Praha : Grada Publishing a.s., 2004. str. 55. 8024706083.

40. —. www.toxicology.cz. *Toxicology*. [Online] [Citace: 05. 04. 2016.] <http://www.toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=323>.

41. www.arome.cz. *Arome*. [Online] [Citace: 5. 04. 2016.] <http://www.arome.cz/clanky/kolik-pizem-znas-1/>.

42. Dong, H., a další. Analysis of 7 synthetic musks in cream by supported liquid extraction. *Talanta*. 2014, Sv. 120, stránky 248-254.

43. Nave, F., Cabrita, M. J. a Costa, C. T. Use of solid-supported liquid-liquid extraction in the analysis. *Journal of Chromatography A*. 2007, Sv. 1169 (1-2), stránky 23-30.

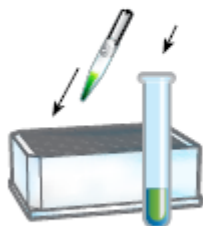
44. *www.evinice.cz*. [Online] [Citace: 7. 04. 2016.] <http://www.evinice.cz/o-vine/latky-ve-vine>.

45. Salava, J. *www.gate2biotech.cz. gate2biotech*. [Online] [Citace: 07. 04. 2016.] <http://www.gate2biotech.cz/zvyseni-hladiny-zdravi-prospesneho-pterostilbenu-v-rostlinach/>.

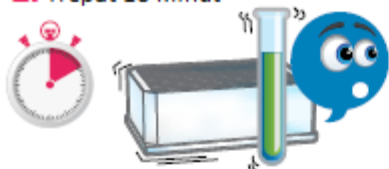
PŘÍLOHA



1. Naředit vzorek 1:1 s puřem nebo vodou a přidat organické rozpouřtředlo



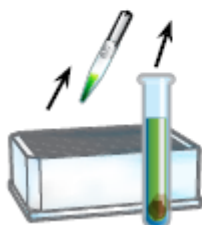
2. Třepat 10 minut



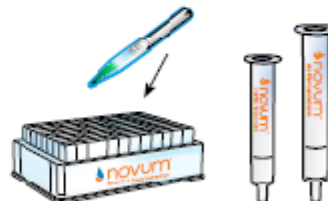
3. Centrifugace 10 minut



4. Odebrání organické vrstvy



1. Naředit vzorek 1:1 s vodou nebo puřem a nanést na sorbent Novum SLE za použití vakua po dobu 2-15 vteřin



2. Počkat 5 minut



3. Použit eluční roztok a nechat vymývat pomocí gravitace. Pro úplné vymytí použít vakuum po dobu 10 vteřin.



Obr. 9 Porovnání provedení extrakce z kapaliny do kapaliny a podporované kapalinové extrakce, převzato z (21).