



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

NÍZKONÁKLADOVÉ MIKROEXTRAKČNÍ A PREKONCENTRAČNÍ POSTUPY PRO BIOMEDICÍNSKÉ APLIKACE

LOW-COST MICROEXTRACTION AND PRECONCENTRATION PROCEDURES FOR BIOMEDICAL
APPLICATIONS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Jan Vašátko

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1285/2018 Akademický rok: 2018/19
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Jan Vašátko**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Nízkonákladové mikroextrakční a prekoncentrační postupy pro biomedicínské aplikace

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše shrnující využití mikroextrakčních a prekoncentračních technik pro analýzu biologických vzorků.

Otestování vhodných separačních systémů v kapilární elektroforéze (CE) a získání vybraných analytických parametrů pro CE stanovení modelových analytů.

Otestování přípravy nových uspořádání a spojení mikroextrakcí přes kapalnou membránu na pevném nosiči s CE pro přímé analýzy modelových analytů.

Otestování vhodných extrakčních podmínek s ohledem na možnosti prekoncentrace modelových analytů.

Spojení vyvinutých mikroextrakčních postupů s CE pro přímé analýzy modelových analytů ve vybraných lidských tělních tekutinách.

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Jan Vašátko
student(ka)

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce se zabývá vývojem nízkonákladových mikroextrakčních technik a jejich aplikací pro přečistění a prekoncentraci biologických vzorků, konkrétně experimentálním studiem extrakcí přes kapalnou membránu zakotvenou na pevném nosiči (SLM). Vyvinutá mikroextrakční technika využívá jako extrakční jednotky komerčně dostupné filtrační destičky a umožňuje extrakci bazických léčiv z biologických vzorků moči a krve (ve formě suchých krevních teček). Praktická část se zabývá optimalizací podmínek mikroextrakce bazických léčiv z reálných vzorků přes SLM v in-line spojení s laboratorní kapilární elektroforézou. Základní optimalizace podmínek mikroextrakce zahrnovala výběr vhodné organické fáze pro impregnaci membrány (směs ENB a DHE v poměru 1:1), vhodných otáček třepačky pro agitaci vzorku během extrakce (1000 rpm) a optimální poměr objemů donoru a akceptoru pro nejvyšší míru zakoncentrování analytů (400:15 μ l). Po základní optimalizaci byl dále zkoumán vliv alkalizace donoru pomocí NaOH na extrakční výtěžnost (ER). U všech použitých matic (fyziologický roztok, neředěné vzorky lidské moči, lidská kapilární krev eluovaná ze suchých krevních teček deionizovanou vodou) bylo nejvyšších hodnot ER dosaženo při použití neutrálního donoru a okyseleného akceptoru. Doba extrakce (60 minut) byla optimalizována na základě časového průběhu mikroextrakce po dobu 120 minut. Takto optimalizovaná mikroextrakční technika je vhodná pro stanovení bazických léčiv v reálných maticích s dosažením dostatečné míry přečistění, prekoncentrace i hodnot ER

ABSTRACT

This thesis focuses on low-cost microextraction techniques and their application for purification and preconcentration of biological samples, specifically on the experimental study of supported liquid membrane (SLM) extraction. The described microextraction technique uses commercially available filtration plates as the extraction units and allows the extraction of basic drugs from biological samples of urine and blood (in the form of dried blood spots). The experimental part includes the optimization of microextraction conditions of basic drugs from real samples through a SLM coupled in-line to lab-made capillary electrophoresis. The basic optimization of microextraction conditions involved selecting the appropriate organic phase for membrane impregnation (1:1 mixture of ENB and DHE), appropriate agitation speed for sample convection during extraction (1000 rpm), and optimal ratio of donor to acceptor volumes for high preconcentration of the analytes (400:15 μ L). After basic optimization, the effect of donor alkalization with NaOH on extraction recovery (ER) was investigated. For all matrices used (saline solution, undiluted human urine samples, human capillary blood eluted from dry blood spots with deionized water), the highest ER values were achieved using a neutral donor and an acidic acceptor. The extraction time (60 minutes) was optimized based on the time profile of the microextraction for 120 minutes. This optimized microextraction method is suitable for the determination of basic drugs in real matrices with sufficient sample clean-up, preconcentration and ER values.

KLÍČOVÁ SLOVA

Mikroextrakce, kapilární elektroforéza, kapalná membrána zakotvená na pevném nosiči, paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou, bazická léčiva, komplexní biologické vzorky, suché krevní tečky

KEY WORDS

Microextraction, capillary electrophoresis, supported liquid membrane, parallel artificial liquid membrane extraction, basic drugs, complex biological samples, dried blood spots

VAŠÁTKO, Jan. *Nízkonákladové mikroextrakční a prekoncentrační postupy pro biomedicínské aplikace*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/116334>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloš Dvořák.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych tímto poděkoval vedoucímu diplomové práce Miloši Dvořákovi a konzultantce Lence Ryšavé za jejich odborné rady, trpělivost, vstřícnost, věnovaný čas a cenné rady při tvorbě diplomové práce. Můj dík patří rovněž Pavlu Kubáňovi, Stanislavu Obručovi a Ivaně Márové za poskytnutí příležitosti vypracovat vědeckou práci ve spolupráci s Ústavem analytické chemie Akademie věd ČR, v. v. i. V neposlední řadě bych rád poděkoval svým rodičům Haně a Jarkovi, prarodičům Jiřině a Jaroslavovi a bratru Albertovi, a také svým nejbližším a spolužákům Lukášovi, Týně, Míši, Lulu a Klaudii za jejich neutuchající podporu a sdílení útrap i radostí studia.

OBSAH

1 ÚVOD	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Mikroextrakce.....	8
2.1.1 Kapalná membrána na pevném nosiči (SLM).....	8
2.1.1.1 Princip extrakcí přes SLM	9
2.1.1.2 Paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou (PALME).....	10
2.1.1.3 Aplikace extrakcí přes SLM	11
2.2 Reálné vzorky	12
2.2.1 Suché krevní tečky (DBS).....	12
2.2.1.1 Výhody DBS	12
2.2.1.2 Postup odběru krve	12
2.2.1.3 Aplikace DBS	14
2.3 Vlastnosti modelových analytů	14
2.4 Kapilární elektroforéza (CE)	16
2.4.1 Instrumentace CE.....	17
2.5 Základní validační parametry CE	18
2.5.1 Linearita metody	18
2.5.2 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).....	18
2.6 Spojení extrakcí přes SLM s kapilární elektroforézou	19
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	20
3.1 Příprava roztoků a použité chemikálie	20
3.1.1 Základní elektrolyt (BGE)	20
3.1.2 Zásobní roztok bazických léčiv.....	20
3.1.3 Reálné vzorky a fyziologický roztok	20
3.1.4 Ostatní roztoky.....	20
3.2 Elektroforetický systém.....	20
3.3 Zařízení a postupy pro SLM.....	21
3.3.1 Extrakce reálné matrice pomocí PALME	22
4 VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1 Optimalizace podmínek mikroextrakce analytů z fyziologického roztoku.....	24
4.1.1 Optimalizace složení organické fáze pro impregnaci PVDF membrány	24
4.1.2 Časová závislost extrakční výtěžnosti na frekvenci agitace vzorku	25
4.1.3 Optimalizace poměru donoru a akceptoru	26

4.1.4	Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce.....	28
4.1.5	Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek	29
4.1.6	Validace mikroextrakce analytů z fyziologického roztoku.....	30
4.2	Mikroextrakce analytů z reálných vzorků	31
4.2.1	Mikroextrakce analytů z neřaděných vzorků lidské moči	31
4.2.1.1	Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce	31
4.2.1.2	Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek	32
4.2.1.3	Validace mikroextrakce analytů z neřaděného vzorku lidské moči.....	33
4.2.2	Mikroextrakce analytů ze vzorků DBS z lidské krve	35
4.2.2.1	Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce	35
4.2.2.2	Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek	36
4.2.2.3	Validace mikroextrakce analytů z DBS z lidské krve	36
5	ZÁVĚR	38
6	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	39
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	47

1 ÚVOD

Příprava vzorku má vliv na všechny následující analytické kroky, a je kritickým krokem pro jednoznačnou identifikaci, potvrzení a kvantifikaci analytů. Základním principem přípravy vzorku je převod reálné matrice na vzorek kompatibilní s koncovou separační či jinou analytickou metodou.

Mezi nejstarší a nejjednodušší metody přípravy vzorku patří extrakce, při které je analyt ze vzorku separován pomocí rozpouštědla tak, aby za optimálního výtěžku a selektivity prošlo k analýze spolu s analyty co nejméně interferujících látek z matrice. Mezi nejstarší způsoby patří extrakce typu kapalina-kapalina, o něco novější potom extrakce na pevné fázi. V posledních dvou desetiletích je neustále vynakládáno úsilí na přizpůsobení těchto metod a vyvinutí nových přístupů vedoucích k úspoře času a materiálu. Jedním z těchto přístupů jsou mikroextrakce, které byly zavedeny roku 1996 [1]. Roku 1986 [2] byla poprvé popsána extrakce biologických vzorků přes kapalnou membránu zakotvenou na pevném nosiči (SLM), která je založena na přenosu analytů přes tenkou membránu inertního nosiče, impregnovanou rozpouštědlem nemísitelným s vodou. Mikroextrakce přes SLM jsou finančně nenáročné díky spotřebě pouze malých množství rozpouštědla i vzorku, a umožňují vysokou míru prekoncentrace analytů díky vysokým poměrům objemů vzorku (donoru) ku akceptoru.

Cílem této diplomové práce byla optimalizace podmínek mikroextrakce analytů z reálných vzorků přes SLM. Jako modelové analyty byly zvoleny bazická léčiva, které byly extrahovány z vybraných reálných matric (neředitelné vzorky lidské moči a lidská krev eluovaná ze suchých krevních teček deionizovanou vodou). Jako analytická metoda pro stanovení extrakčních výtěžností analytů byla zvolena laboratorní soustava kapilární elektroforézy v in-line spojení s mikroextrakcí, kdy výsledný extrakt byl dávkován přímo z rozhraní mezi SLM a akceptorem.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Mikroextrakce

Mikroextrakce je metoda používaná k úpravě vzorků a k izolaci analytů z dané matrice. V analytické chemii jsou dva důvody pro úpravu komplexních vzorků před vlastní analýzou. Eliminace složek matrice vzorku, které by mohly dále interferovat s hledanými analyty, a prekoncentrace, která je nutným krokem v případě, že je koncentrace analytů pod úrovní detekce přístroje [3]. Ideální způsob úpravy vzorku zahrnuje minimální ztrátu objemu vzorku s co nejvyšší výtěžností analytů. Úprava komplexního vzorku by měla být jednoduchým, rychlým a levným způsobem odstranění interferujících látek ze vzorku [4]. Metoda by měla být kompatibilní s nejčastěji používanými koncovými analytickými metodami, jako jsou chromatografické techniky [5], hmotnostní spektrometrie [6] či kapilární elektroforéza [7].

Tradičními přístupy k této problematice jsou například extrakce typu kapalina-kapalina (LLE), nebo extrakce na pevné fázi (SPE). Tyto metody jsou snadno prováděné v sériích, proto se často využívají v klinických aplikacích. Nevýhodou těchto metod je však nutnost dalšího přístrojového vybavení, velké objemy organických rozpouštědel a biologických vzorků, a také jsou finančně a časově náročné [3]. Vývoj úpravy vzorků před analýzou proto směřuje k miniaturizaci a zároveň k poskytnutí podstatně nižších finančních nákladů na analýzu. Tyto předpoklady splňují mikroextrakční techniky, které mají též nižší spotřebu biologických vzorků a díky nižší spotřebě organických rozpouštědel mají i menší dopad na životní prostředí. Je snaha o přímé (on-line) spojení s koncovou analytickou technikou, což vede ke zjednodušení celého procesu a vyšší analytické účinnosti [4]. Při vývoji nových mikroextrakčních technik se hlavní pozornost věnuje mikroextrakcím v kapalné fázi (SDME – mikroextrakce jednou kapkou, DLLME – disperzní mikroextrakce typu kapalina-kapalina,) a na pevné fázi (sorpční mikroextrakce), zvláštní roli mají též mikroextrakční techniky založené na přenosu analytů přes membrány (HF-LPME – mikroextrakce přes duté vlákno, SLM – mikroextrakce přes kapalnou membránu zakotvenou na pevném nosiči, EME – elektromembránová extrakce a mikrodialýza) [3, 8].

Mikroextrakční techniky na bázi membrán jsou založeny na použití polymerních membrán, které slouží jako nosič kapalné organické fáze. Membrána je impregnována extrakčním činidlem, které je imobilizované v pórech membrány, přes kterou následně probíhá difuze analytů do akceptoru [9]. Hojně využívanou metodou spadající pod membránové extrakce je HF-LPME na bázi porézního tubulárního polypropylenového vlákna [10, 11]. Další technika membránové extrakce je založena na SLM, která využívá planárního geometrického uspořádání membrány, která slouží jako pevný nosič pro organickou fázi. PALME je nová alternativní technika mikroextrakce, která využívá stejného principu jako SLM, který je podrobně popsán v kapitole 2.1.1.

2.1.1 Kapalná membrána na pevném nosiči (SLM)

SLM (supported liquid membrane) využívá membrány z tenkého inertního porézního polymerního materiálu (nejčastěji polypropylen (PP), polytetrafluoretylen (PTFE)), který je impregnován vhodným rozpouštědlem nemísitelným s vodou a je použit jako selektivní bariéra mezi dvěma vodnými roztoky. Tato bariéra je stabilní inertní nosič, a díky tomu nedochází

k promíchání obou vodných fází. Roztok donoru obsahující sledované analyty ve vodné matrici se umístí na jednu stranu SLM, zatímco roztok akceptoru je umístěn na opačné straně SLM a je analyzován po dokončení procesu extrakce. Správný výběr složení kapalné membrány (např. polarita organického rozpouštědla, přidávání různých iontových nosičů a/nebo aditiv pro zvýšení selektivity) a roztoku donoru a akceptoru (např. složení, iontová síla a hodnota pH) jsou nezbytné pro účinný přenos analytů z roztoku donoru přes SLM do roztoku akceptoru [3].

2.1.1.1 Princip extrakcí přes SLM

V difuzně řízených extrakcích přes SLM jsou analyty obvykle ve vodném roztoku donoru neutrální, a přecházejí organickou fází SLM v neutrálním stavu. Princip SLM je zobrazen na Obr. 1. Na opačné straně se z SLM analyty uvolňují ve formě iontů do vodného roztoku akceptoru o odlišných hodnotách pH oproti donoru. Tento rozdíl hodnot pH vytváří tzv. pH gradient, díky kterému dochází k účinnému přechodu analytů z SLM a zamezí se jejich zpětné extrakci [12, 13].

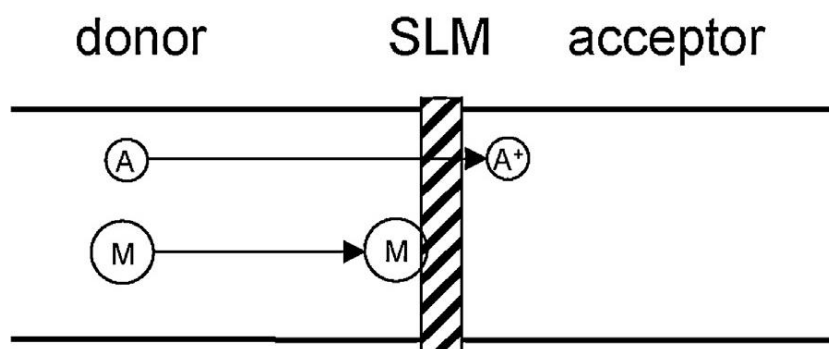
Hnací silou hromadného přenosu přes membránu je gradient potenciálu skrze různé difuzní vrstvy (vnější vrstva a kapalná membrána), který je popsán Fickovým prvním zákonem (1):

$$J_i = -D_i \frac{dC_i}{dx} \quad (1)$$

kde J_i je difuzní tok hromadného přenosu rozpuštěné látky, D_i je difuzní koeficient látky i , C_i je koncentrace rozpuštěné látky a x je směr difuze. Za předpokladu lineárního koncentračního gradientu získáváme integrací rovnice (1) následující výraz (2):

$$J_i = \frac{D_i}{\delta} \Delta C_i = k_i \Delta C_i \quad (2)$$

kde δ je tloušťka difuzní vrstvy a k_i je odpovídající koeficient hromadného přenosu [14].



Obr. 1: Schematické znázornění přenosu analytů přes SLM; za přenos analytů je zodpovědný pH gradient. A – analyt; A⁺ – analyt v iontové formě; M – složka matrice; M⁺ – složka matrice v iontové formě [3].

Pro přečištění vzorku může být poměr roztoku donoru a akceptoru 1:1 [15], nicméně při snížení objemu akceptoru je možné dosáhnout kromě přečištění vzorku též jeho zakonzentrování [16]. Po extrakci přes SLM může být roztok akceptoru přímo dávkován

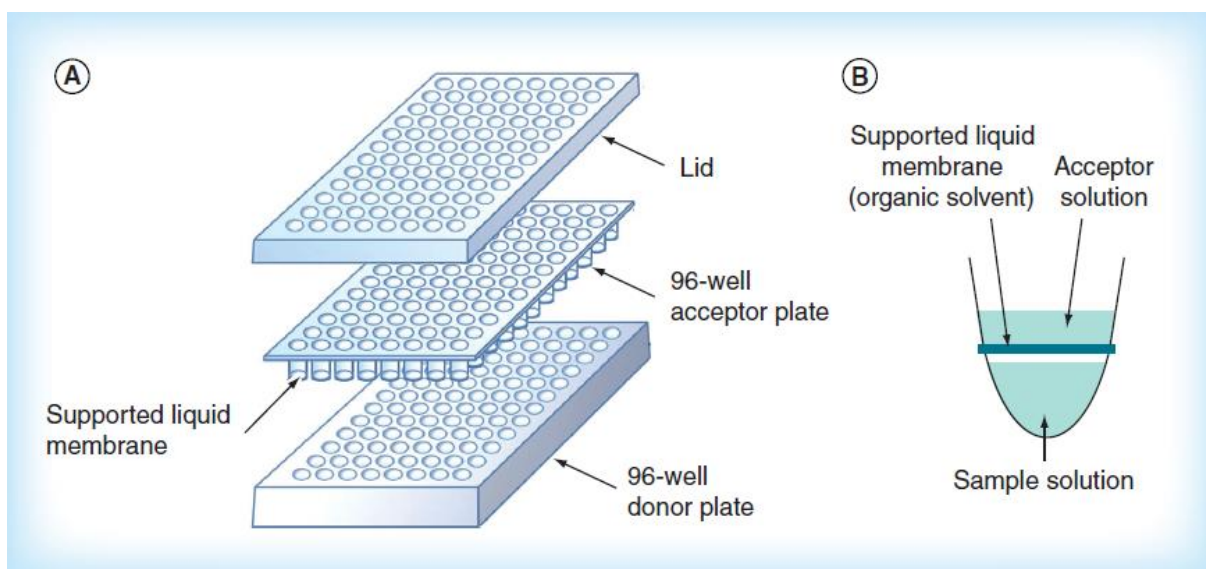
do analytického systému, jako je např. kapalinová chromatografie [17] nebo kapilární elektroforéza [16].

2.1.1.2 Paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou (PALME)

V nedávné době byl prezentován nový přístup k poloautomatizaci SLM nazývaný paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou (PALME – parallel artificial liquid membrane extraction), jejímž cílem je umožnit průběh až 96 extrakcí zároveň, čímž je usnadněna manipulace se vzorky a snížena časová i finanční náročnost analýz [18].

Metoda PALME je založena na systému skládajícím se z filtrační desky s 96 jamkami (akceptorovou deskou) obsahující porézní filtr na dně každé z jamek, který po impregnaci organickým rozpouštědlem slouží jako SLM pro mikroextrakci (viz Obr. 2). Původním účelem 96-jamkové filtrační desky, bez impregnace membrány organickým rozpouštědlem, je využití pro bioassaye [19–22]. Filtrační desky s 96 jamkami dodává např. firma Merck spol. s r.o. Desky jsou dostupné s filtry z různých materiálů (PVDF – polyvinylidendifluorid, PTFE – polytetrafluoretylen) o různé velikosti pórů (0,22–1,2 μm pro PVDF, 0,45 μm pro PTFE) a různých vlastnostech (hydrofilní/ hydrofobní, odolné vůči organickým rozpouštědlům, přizpůsobené ultrafiltraci apod.) [23].

Extrakce přes SLM v PALME je podporována příznivým pH gradientem, přičemž vodný roztok akceptoru je přímo kompatibilní například s LC-MS nebo kapilární elektroforézou bez nutnosti odpařování a rekonstituce. Vzhledem k tomu, že objem vzorku (200–400 μl), organického rozpouštědla (3–5 μl /vzorek) a roztoku akceptoru (50–100 μl) jsou v μl měřítku, PALME je považována za mikroextrakční metodu [24].



Obr. 2: Paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou. (A) Spodní část je donorová destička (vzorek), prostřední část tvoří akceptorová deska (syntetická kapalná membrána a roztok akceptoru) a horní část je víko, které zabraňuje odpařování. (B) Schematické zobrazení jedné extrakční jednotky [18].

2.1.1.3 Aplikace extrakcí přes SLM

Standardní extrakce přes SLM zahrnují SLM na plochem nosiči (FSSLM – flat sheet supported liquid membrane) a SLM imobilizovanou v membráně z dutých vláken (HFSLM – hollow fibre supported liquid membrane). Ploché uspořádání je výhodné pro laboratorní účely, méně však pro potřeby průmyslu, protože poměr plochy povrchu k objemu je příliš nízký [14].

V průmyslu má široké uplatnění HFSLM. Využívá se zejména v hydrometalurgických procesech pro regeneraci kovových iontů (např. Zn, Cd) z odpadních vod, kde je třeba vysoká selektivita a distribuční koeficient [25]. Metoda se využívá také pro odstranění iontů těžkých kovů (zejména Cd, Hg a Cr) z odpadních vod, kde je třeba účinného způsobu přečištění vzorku [26].

Extrakce přes SLM též slouží, díky své schopnosti prekoncentrace analytů ve vzorku, jako vhodná laboratorní metoda úpravy vzorků pro analýzu léčiv, které se v reálných vzorcích vyskytují ve velmi nízkých koncentracích. Léčiva se stanovují např. ve vzorcích odpadních vod, kde se vyskytují jako polutanty [27], nebo v biologických vzorcích, které jsou příliš komplexní pro samotnou analýzu bez úpravy. Tyto vzorky zahrnují matrice, jako je krevní plazma [28], plná krev [29], moč či mateřské mléko [30].

Poloautomatizace extrakcí přes SLM, PALME, se od svého zavedení v roce 2013 [18] používá především pro extrakci léčiv z biologických vzorků, a to zejména z krevní plazmy nebo krve. Další alternativou využití PALME je odstraňování fosfolipidů z krevní plazmy, kde mohou fosfolipidy působit jako příčina iontové suprese v LC-MS [31]. PALME bylo též použito jako metoda pro monitorování terapeutických léčiv, a to konkrétně inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu a serotonin-norepinefrinu v lidské plazmě. V tomto případě byla učiněna první automatizace metody použitím poloautomatizovaného pipetoru [24]. PALME je vhodnou metodou pro přečištění vzorků polárních bazických [32] i kyselých [33] léčiv v krevní plazmě.

Vhodnost PALME jako metody pro extrakci vzorků s komplexní matricí (např. plná krev) byla zkoumána na vybraných psychoaktivních látkách, a jeví se jako atraktivní např. pro forenzní toxikologii. Při analýze plné krve se mohou vyskytnout komplikace z důvodu obsahu krevních buněk a bílkovin, které mohou způsobit ucpání kolony [34]. PALME se dále využívá pro extrakce benzodiazepinů a experimentálních benzodiazepinů ze zředěných vzorků plné krve, které představují výzvu vzhledem k extrémně nízkým hodnotám pK_a [35]. PALME byla též kombinována se speciální mikrovzorkovací technikou – suchými krevními tečkami s koncovou analýzou pomocí UHPLC-MS [36].

Jako koncovou analytickou metodu sloužící k analýze výsledného roztoku akceptoru extrahovaného přes SLM lze použít kapalinovou chromatografii s hmotnostní spektrometrií, či jejich modifikace (HPLC, UHPLC-MS, LC-MS/MS, apod.) [24, 31–36]. S těmito analytickými metodami jsou však vzorky spojeny off-line. V této diplomové práci byl zkoumán potenciál kapilární elektroforézy jako koncové analytické metody též pro její schopnost in-line spojení s analyzovanými vzorky.

2.2 Reálné vzorky

Aktuální biomedicínský výzkum sloučenin s nízkou molekulární hmotností se zaměřuje především na analýzu farmaceuticky významných sloučenin, jako jsou biomarkery, toxické látky, a především léčiva v různých biologických matricích, např. moč, krevní plazma, krevní sérum či plná krev [37].

Moč obsahuje odpadní látky filtrované z krve ledvinami pro udržení homeostázy tělních tekutin. Moč se skládá z přebytečné vody, sacharidů, vysoké koncentrace močoviny z metabolismu aminokyselin, anorganických solí (Cl, Na, K), kreatininu, amoniaku, organických kyselin, ve vodě rozpustných toxinů a pigmentových produktů rozpadu hemoglobinu [38]. Výhodou moči jako matrice je možnost analyzovat vzorek bez nutnosti ředění a možnost neinvazivního odběru vzorku, což je atraktivní zejména pro rychlé analýzy v klinickém prostředí [39].

Krev, ať již ve formě plné intravenózní krve či suchých krevních teček, obsahuje vysoké koncentrace proteinů (~70 g/l), malé anorganické ionty (~300 mM), lipidy (~8 g/l) a také značné koncentrace dalších biochemicky významných sloučenin jako je glukóza, močovina, aminokyseliny a mastné kyseliny. Vzhledem k problémům, jež mohou tyto komponenty způsobovat (ucpávání kolon, sorpce na membránu při mikroextrakci apod.) je třeba při analýze jakékoli formy krve postupovat pečlivě a vybrat vhodnou metodu úpravy vzorku pro eliminaci vlivu takto komplexní matrice [3]. Pro simulaci prostředí reálné matrice slouží fyziologický roztok (roztok 150mM NaCl v deionizované vodě, což odpovídá střední hodnotě obsahu solí v krvi i v moči, kde se běžně vyskytuje v koncentračním rozmezí 50–250 mM) [40].

2.2.1 Suché krevní tečky (DBS)

Běžně slouží pro terapeutické monitorování léčiv vzorky plné krve, krevního séra či plazmy z přímo odebrané žilní krve. Alternativním způsobem vzorkování plné krve jsou suché krevní tečky (DBS – dried blood spots), kde způsob vzorkování a uchování vzorku přináší oproti intravenóznímu odběru krve značné výhody [41].

2.2.1.1 Výhody DBS

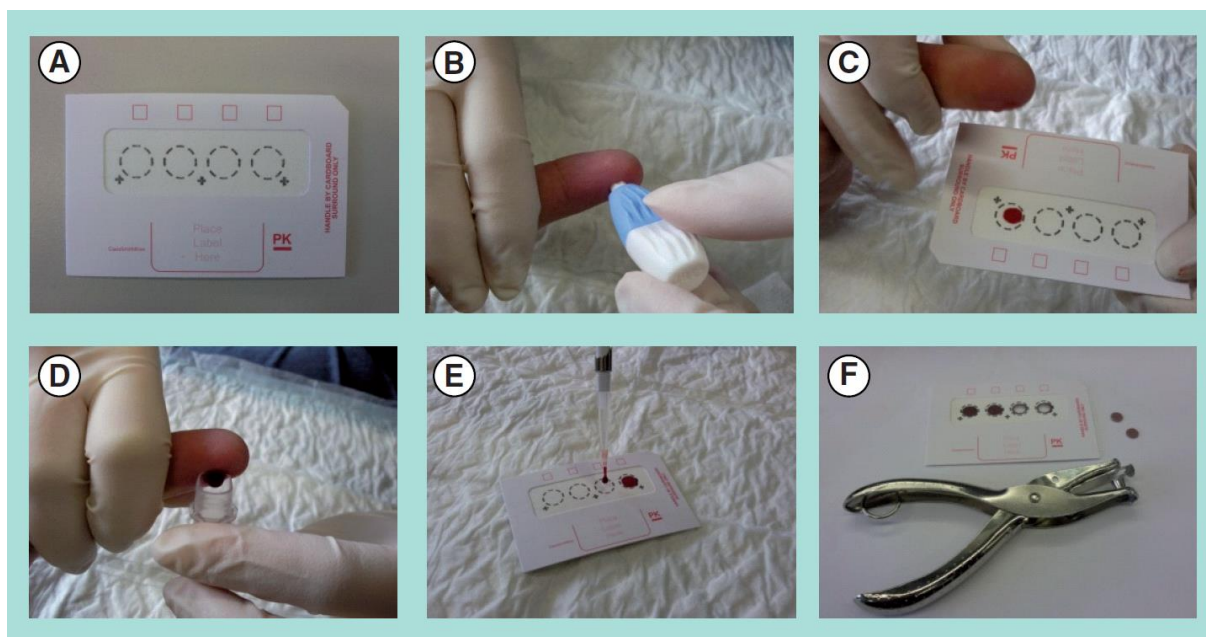
Odběr krve pro DBS je méně invazivní než odběr intravenózní krve (pro odběr DBS je třeba pouze vpich do paty či špičky prstu automatickou lancetou, zatímco pro odběr intravenózní krve je nutné zavést sterilní injekční jehlu do žíly). Pro jeden vzorek DBS je též třeba mnohem nižší objem krve (řádově v μ l) ve srovnání s odběrem intravenózně (řádově v ml). Jednoduchost procesu odběru krve navíc zajišťuje, že pacienti budou schopni odebrat vzorek krve sami, a následně ho odeslat do laboratoře běžnou poštou. Vzhledem ke stabilitě vzorku je sníženo riziko přenosu infekce HIV/AIDS, hepatitidy a dalších infekčních patogenů. DBS nekladou vysoké nároky na uchování, zatímco vzorky intravenózní krve je třeba uchovávat ve zkumavkách s obsahem antikoagulantů či dalších aditiv v chladicích boxech [41, 42].

2.2.1.2 Postup odběru krve

Vpich pro odběr vzorku krve je učiněn pomocí jednorázového lancetového přístroje (viz Obr. 3). Pro běžné použití je hloubka vpichu lancety většinou 2 mm. Před tím, než dojde k vpichu, je vhodné místo prohrát a vydesinfikovat. Prohrátí kůže prstu před vpichem usnadní

odběr, protože zvyšuje rychlost proudění krve do prstu a je tak umožněno provést více odběrů, než dojde k zastavení toku krve z místa vpichu. Během prohřívání kůže prstu nedochází k výrazným změnám v rámci klinických parametrů – prohřátí prstu nemá vliv na množství léčiv v následně odebrané krvi [43]. Po desinfekci se kůže nechá volně oschnout, aby se zabránilo hemolýze způsobené směsí vody s alkoholem [44]. První kapka krve obsahuje více tkáňové tekutiny a je setřena sterilní gázou. Příliš silné mačkání rány a snaha o vytlačení kapky krve mohou způsobit hemolýzu a uměle zvýšit množství přítomných tkáňových tekutin ve vzorku DBS [43, 45].

Po provedení vpichu a setření první kapky krve je aplikováno určité množství krve na vyznačené místo na vzorkovací kartičce (natisknutý přerušovaný kruh). Volně vyteklá kapka krve má objem typicky do 50 μl . Po usušení na vzduchu je DBS získána vyříznutím vzorku krve na papíru zařízením k tomu určeným (speciální razidla, korkovrt, apod.). V případě, že je takto vyříznuta jen část vzorku krve, odebírá se vzorek ze spodní strany vzorkovací kartičky, aby nedošlo k vyříznutí části nenasycené krví. Typický objem krve v takto vyříznuté DBS je asi 10 μl [46]. Druhou možností přípravy DBS vzorku je volně tekoucí krev nejprve odebrat do zkumavky (s možným přidavkem antikoagulantu), a následně aplikovat přesně daný objem krve na vzorkovací kartičku pomocí pipety. Na Obr. 3-F je DBS vytvořena vyříznutím celého vzorku krve ze vzorkovací kartičky. Po vyříznutí DBS je vzorek připravený k následné analýze [47].



Obr. 3: Základní metodika přípravy DBS. (A) Vzorkovací kartička z filtračního papíru. (B) Na špičce prstu, patě, či jiném odběrovém místě je proveden vpich bezpečnostní lancetou. (C) Kapka kapilární krve se převede přímo na vzorkovací kartičku; nebo (D) se kapilární krev nejdříve převede do vialky, a následně (E) se přesně daný objem krve pipetuje na vzorkovací kartičku. (F) Po usušení na vzduchu se ze vzorkovací kartičky DBS vyřízne a je dále analyzována [47].

V případě vyříznutí jen části vzorku krve jako DBS je nutné brát v potaz vliv hematokritu. Hematokrit udává objemový poměr erytrocytů a plazmy v krvi, a může mít přímý vliv na přesnost stanovení analytů ve vzorku. Různé hodnoty hematokritu totiž způsobují různé

šíření krve po papíru vzorkovací kartičky [48]. Komplikaci způsobuje též fakt, že různá léčiva mají různý distribuční faktor pro krev/plazmu, a proto budou mít hodnoty hematokritu na různá léčiva rozdílné účinky [49]. V současné době existuje několik přístupů, jak eliminovat vliv hematokritu na analýzu léčiv; jedním z nich je vyříznutí celého vzorku krve ze vzorkovací kartičky jako DBS (o předem definovaném objemu krve), a ne jen jeho části [50].

2.2.1.3 Aplikace DBS

DBS jsou pro svůj jednoduchý a málo invazivní způsob odběru často využívány pro screening novorozenců na přítomnost různých dědičných metabolických poruch [51]. Počátek využití DBS se datuje do roku 1963 [52], kdy byly poprvé DBS použity jako matrice pro screening fenylketonurie u novorozenců. Dále byly DBS použity pro screening hemoglobinopatie (mutace genů v řetězci hemoglobinu) a screening karbohydrát deficitního transferinu (CDT), který souvisí s chronickým požíváním alkoholu [53].

DBS se v současnosti používají i pro monitoring konzumace alkoholu pomocí měření markerů etanolu [54], a lze je využít i pro screening prenatální expozice alkoholu u novorozenců [55]. Využití DBS je i v oblasti terapeutického monitorování léčiv, toxikokinetice, farmakokinetice [42], klinických studiích vývoje léčiv, pediatrických studiích [56] a v neposlední řadě i při studiích dopingů a genotypování nebo testování DNA a RNA [57]. Pro forenzní i klinické účely byla též využita pro koncovou analýzu léčiv z DBS kapilární elektroforéza, konkrétně pro stanovení kyseliny gama-hydroxymáselné, která slouží jako silný inhibitor centrálního nervového systému (CNS) [58].

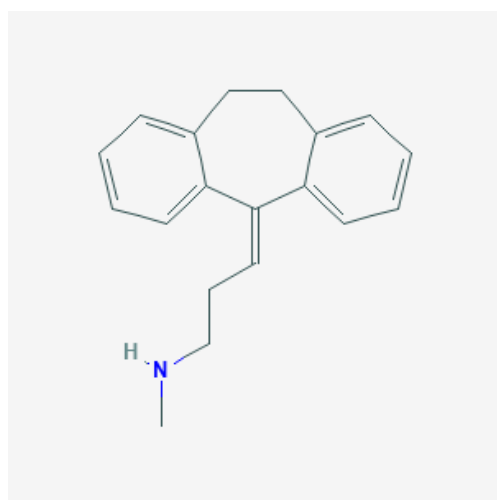
2.3 Vlastnosti modelových analytů

Při přípravě vzorku je důležitá charakteristika jeho počátečního fyzikálně-chemického stavu, ze které vycházíme při volbě dalších kroků [59]. Mezi důležité informace při analýze léčiv patří hodnoty $\text{Log } K_{ow}$ (rozdělovací koeficient pro systém n-oktanol/voda) a pK_a (záporný dekadický logaritmus disociační konstanty kyseliny), které nám mohou poskytnout informace o tom, za jakých podmínek se budou analyty spíše koncentrovat – zda v hydrofilním, či hydrofobním prostředí. Hodnota $\text{Log } K_{ow}$ slouží jako indikátor lipofility vzorku. Vyšší hodnoty $\text{Log } K_{ow}$ jsou typické pro hydrofobní sloučeniny, zatímco nízkými hodnotami $\text{Log } K_{ow}$ se vyznačují sloučeniny rozpustné ve vodě. Rychlost ionizace kyselých či bazických funkčních skupin léčiv závisí na hodnotě disociační konstanty (pK_a) a děj je řízen hodnotou pH roztoku. Hodnoty $\text{Log } K_{ow}$ a pK_a modelových analytů použitých v této diplomové práci jsou uvedeny v Tab. 1. Se znalostí těchto hodnot je potom možné zvolit nejlepší metodu pro analýzu léčiv (dle hodnoty pK_a může být upravena hodnota pH roztoku vzorku; $\text{Log } K_{ow}$ ukazuje afinitu léčiv k vodě (k polárním/nepolárním sloučeninám)) [60].

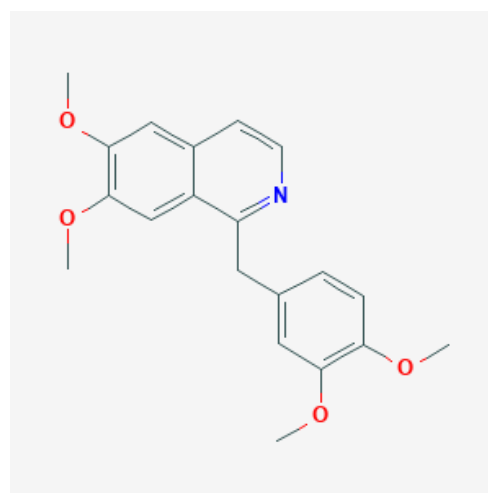
Důležitou informací je také terapeutická koncentrace léčiva, která představuje koncentraci léčiva v krevní plazmě po podání terapeuticky účinné dávky s pozorováním žádných či minimálních vedlejších účinků (viz Tab. 1) [61]. Chemické struktury jednotlivých bazických léčiv použitých jako modelové analyty v této diplomové práci jsou vyobrazeny na Obr. 4.

Tab. 1: Fyzikálně-chemické vlastnosti vybraných bazických léčiv [61–63].

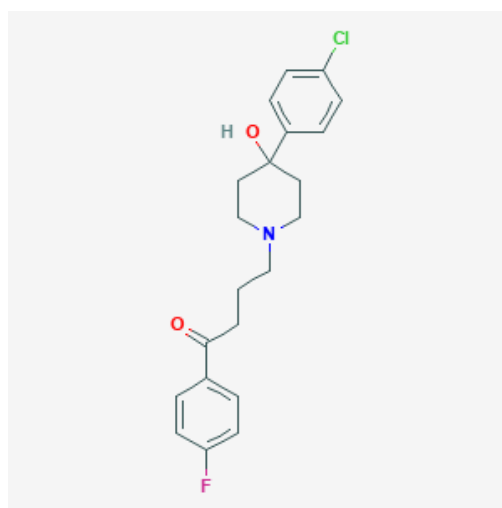
Analyt	Sumární vzorec	Molekulová hmotnost [g/mol]	Terapeutická koncentrace [mg/l]	Log K_{ow}	pK_a
Nortriptylin	$C_{19}H_{21}N$	263,384	0,02–0,2	4,51	10,47
Papaverin	$C_{20}H_{21}NO_4$	339,391	0,2–2	3,08	6,03
Haloperidol	$C_{21}H_{23}ClFNO_3$	375,868	0,005–0,02	4,30	8,66



Nortriptylin



Papaverin



Haloperidol

Obr. 4: 2D struktura vybraných bazických léčiv [62].

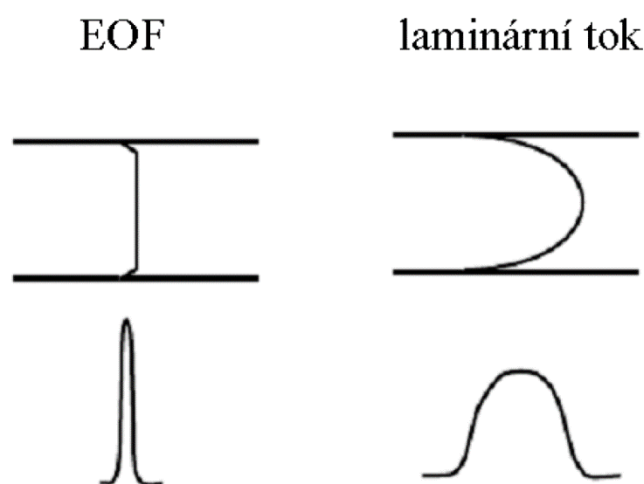
2.4 Kapilární elektroforéza (CE)

Elektroforéza je separační metoda, která je založena na pohybu nabitých částic v elektrickém poli. Mobilita jednotlivých iontů je závislá na jejich velikosti a náboji – menší analyt se bude pohybovat rychleji než větší ion o stejném náboji. Tento jev se označuje jako elektroforetická pohyblivost (3):

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3)$$

kde μ_e je elektroforetická mobilita, q je velikost náboje, η je viskozita roztoku a r je průměr částice. Základním separačním prostředím je kapilára [64].

Během separace v kapiláře bez ochranného povlaku dochází k jevu zvanému elektroosmotický tok (EOF – electroosmotic flow). Ve stěně kapiláry dochází k ionizaci silanolových skupin a jejich nabití záporným nábojem. Následně dochází k interakci s elektrolytem a dojde k vytvoření dvojvrstvy z kladných iontů roztoku. Po vložení napětí migruje obsah kapiláry díky EOF směrem k záporně nabitě elektrodě. Díky elektrické dvojvrstvě je profil EOF pístový, na rozdíl od parabolického profilu laminárního toku vyvolaného rozdílem tlaku, což vede k vyšší separační účinnosti CE (viz Obr. 5) [65].



Obr. 5: Profil EOF a laminárního toku a jejich vliv na výsledný tvar píku při CE [66].

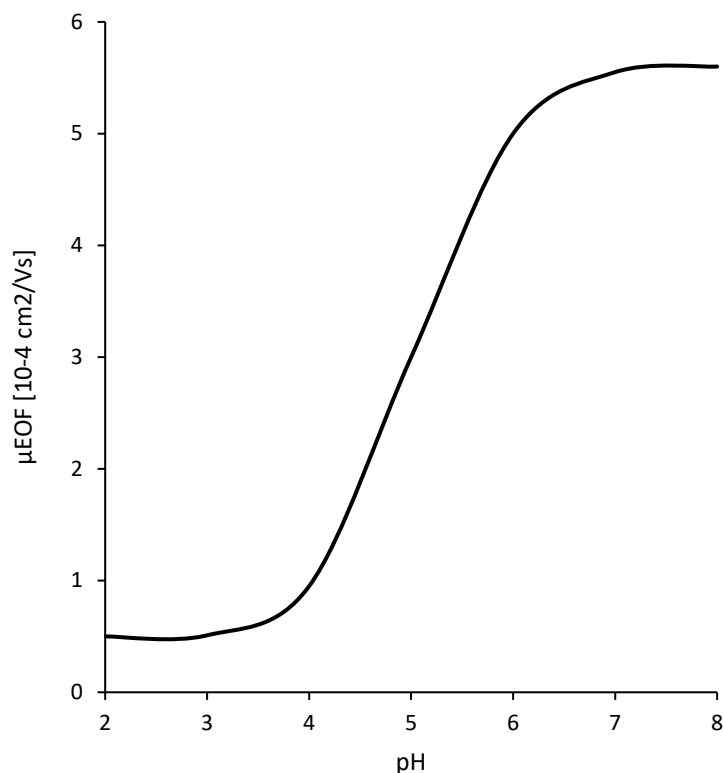
Na míru ionizace silanolových skupin ve stěně kapiláry má vliv pH roztoku elektrolytu (viz Obr. 6). S rostoucí hodnotou pH bude růst i síla EOF. Mobilita EOF (μ_{EOF}) je dána následujícím vztahem (4):

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{4\pi n} \quad (4)$$

kde ε je dielektrická konstanta prostředí, ζ je zeta potenciál elektrické dvojvrstvy a n je viskozita prostředí. Zeta potenciál elektrické dvojvrstvy je vypočten dle vztahu (5):

$$\zeta = \frac{4\pi\delta e}{\varepsilon} \quad (5)$$

kde δ je tloušťka elektrické dvojvrstvy a e je náboj na jednotku plochy [67].



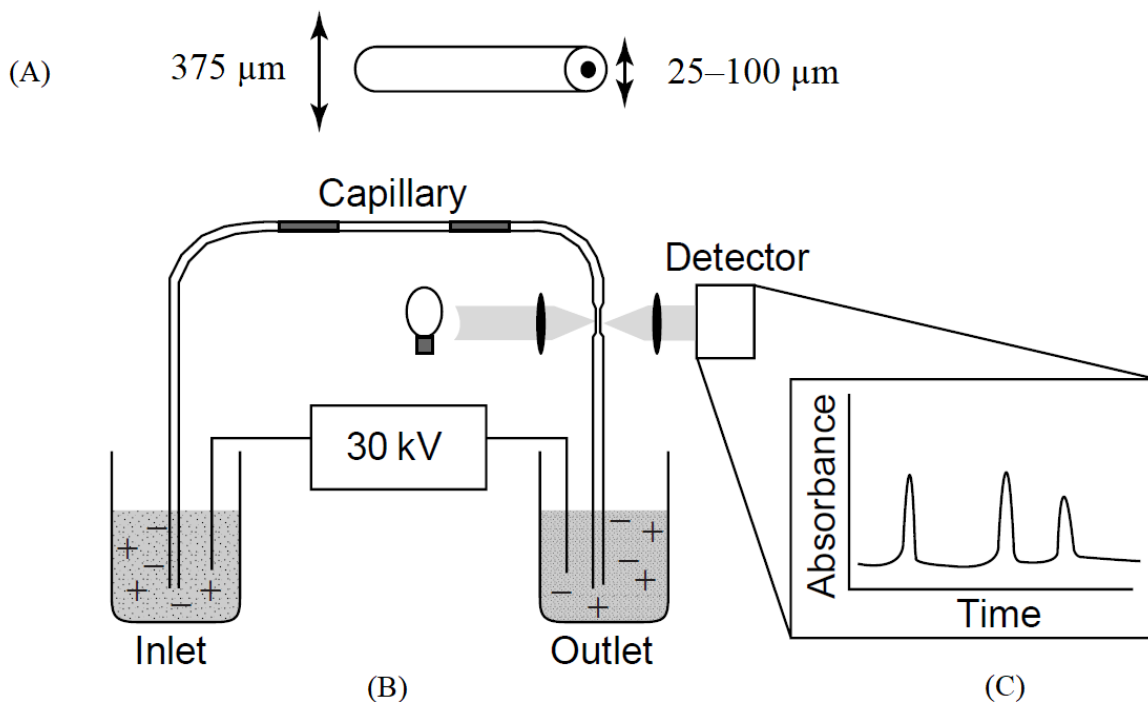
Obr. 6: Vliv pH silanolových skupin v křemenné kapiláře CE na mobilitu EOF [67].

2.4.1 Instrumentace CE

Instrumentace CE je zobrazena na Obr. 7-B. K separaci analytů dochází uvnitř kapiláry. Ta bývá nejčastěji z křemenného skla potažena vrstvou polyimidu, který zajišťuje flexibilitu jinak křehké kapiláry. Běžné rozměry kapiláry jsou: délka v rozmezí 20–100 cm, vnitřním průměr v rozmezí 25–100 μm a vnější průměru 375 μm . Kapilára je naplněna roztokem základního elektrolytu a oba konce jsou ponořeny do nádob obsahující tentýž elektrolyt. Do těchto nádob jsou zavedeny dvě elektrody, z nichž jedna je připojena na zdroj vysokého napětí, který poskytuje napětí v rozmezí 10–30 kV, a druhá je uzemněna. Elektrody bývají z inertního materiálu, jako je např. platina [68, 69].

Existuje několik způsobů hydrodynamického dávkování vzorku do kapiláry. Dávkování je možné uskutečnit působením přetlaku na nádobu se vzorkem, působením vakua na opačný konec kapiláry po zasunutí jednoho konce do nádoby se vzorkem, nebo pomocí rozdílné výšky hladin, který byl použit v této diplomové práci. Při hydrodynamické metodě dávkování je vhodné, aby měly jak vzorek, tak elektrolyt stejnou viskozitu [70]. Mezi další způsoby dávkování patří např. elektromigrační [71].

Po hydrodynamickém nadávkování vzorku, jehož objem zabere zhruba 1 % objemu kapiláry (1–20 nl), se zapne zdroj napětí a dojde k separaci analytů na základě jejich elektroforetických mobilit (viz rovnice (3)). Analyty postupně projdou optickým systémem detektoru (např. UV-VIS). Data jsou následně vyhodnocena počítačem s příslušným softwarem, který vytvoří záznam zvaný elektroforeogram, viz Obr. 7-C [68].



Obr. 7: Instrumentace kapilární elektroforézy. (A) Rozměry kapiláry. (B) Kapilární elektroforéza. (C) elektroforeogram [68].

2.5 Základní validační parametry CE

2.5.1 Linearita metody

Linearita metody udává schopnost analytického postupu získat odezvu, která je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku. Pokud je metoda lineární, jsou výsledky analýzy (přímo, či po aplikaci přesně dané matematické transformace) úměrné koncentraci analytu ve vzorku v daném pracovním rozmezí [72].

V praxi je běžně linearita kalibrační křivky dána hodnotou korelačního koeficientu (R^2). Linearita metody je považována za přesnou v případě, že se hodnota korelačního koeficientu rovná jedné. [73]

2.5.2 Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ)

Mez detekce (LOD – limit of detection) CE je dána nejmenším množstvím analytu ve vzorku, které ještě může být detekováno a vyvolá odezvu měřicího systému, která je rozpoznatelná od okolních vlivů. Jedná se o takovou koncentraci analytu (S), která vyvolá odezvu měřicího přístroje třikrát větší, než je úroveň šumu (N) pozadí $S/N \geq 3$ [74].

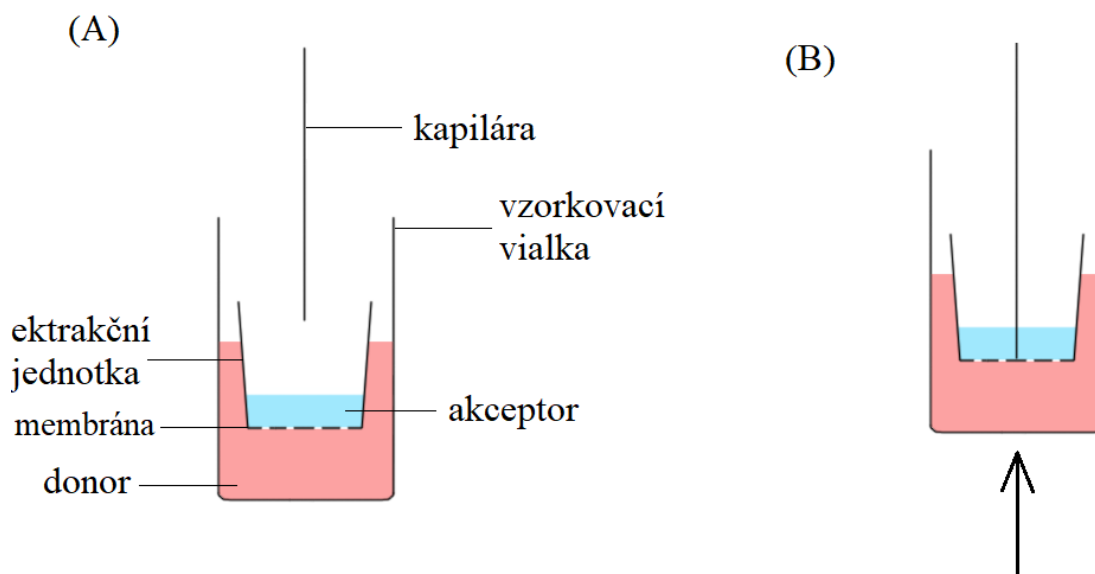
Mez stanovitelnosti (LOQ) CE je nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovaným stupněm přesnosti a správnosti kvantitativně vyhodnotit. Jedná se o takovou koncentraci analytu (S), která vyvolá odezvu měřicího přístroje desetkrát větší, než je úroveň šumu (N) pozadí $S/N \geq 10$ [74].

2.6 Spojení extrakcí přes SLM s kapilární elektroforézou

CE je jednou z vhodných metod pro analýzu vzorků v kombinaci s extrakcí přes SLM. Jedná se o metodu nenáročnou na instrumentalizaci, dosahuje vysoké separační účinnosti s velmi krátkou dobou analýzy a minimální spotřebou reagentů, vzorků i spotřebních materiálů [75].

Pro úpravu vzorků DBS bylo použití SLM extrakce publikováno pouze jedenkrát [36]. Schopnost úpravy vzorků krve pro následnou analýzu bazických a kyselých léčiv off-line spojením s UHPLC-MS/MS byla dostačující. Vzhledem k tomu, že výstupní roztok akceptoru po extrakci přes SLM je vodný a obsahuje analyty ve formě iontů, může být použit přímo pro analýzu pomocí CE. Objem roztoku akceptoru bývá typicky 5–50 μl , což umožňuje i opakovanou analýzu jednoho vzorku, vzhledem k běžně dávkovanému objemu vzorku do kapiláry (1–20 nl). Roztok akceptoru je možné do kapiláry dávkovat i přímo z povrchu SLM [3, 76]. Dávkování vzorku z extrakční jednotky do CE kapiláry je zobrazeno na Obr. 8.

Nevýhoda CE tkví v nižších detekčních limitech, nicméně tento fakt je kompenzován prekoncentrací analytů různými poměry donoru a akceptoru během extrakce přes SLM. Mikroextrakce řeší i další nevýhodu CE, což je nízká kompatibilita s komplexními vzorky, pomocí přečištění vzorku a extrakcí analytů do čistého roztoku akceptoru [77]. V této diplomové práci je pro úpravu vzorků DBS kombinována extrakce přes SLM s CE jako koncovou analytickou metodou.



Obr. 8: Dávkování roztoku akceptoru z povrchu SLM membrány do kapiláry CE systému. (A) Extrakční jednotka ve vzorkovací vialce před dávkováním vzorku. (B) Dávkování extraktu dotekem kapiláry povrchu SLM.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Příprava roztoků a použité chemikálie

3.1.1 Základní elektrolyt (BGE)

Pro zajištění dostatečné vodivosti vzorku pro CE je nutné připravit vhodný BGE. BGE pro CE bazických léčiv byl připravován z 15 mM dihydrogenfosforečnanu sodného (Fluka, Německo) s přídatkem 15 mM kyseliny fosforečné (Pliva-Lachema, ČR) o výsledném pH 2,33. Takto připravený pufr byl filtrován přes jednorázový stříkačkový filtr o velikosti pórů 0,45 μm (Minisart RC 25m, Německo) a následně ponechán po dobu alespoň tři minut v ultrazvukové lázni.

3.1.2 Zásobní roztok bazických léčiv

Zásobní roztoky modelových analytů, obsahující bazická léčiva (nortriptylin, papaverin a haloperidol) v koncentraci 1 g/l (Sigma, Německo), byly připraveny navážením čisté substance (papaverin, haloperidol), nebo z jejich hydrochloridových solí (nortriptylin) a rozpuštěním v čistém metanolu (Sigma). Tyto roztoky byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a chráněny před světlem.

3.1.3 Reálné vzorky a fyziologický roztok

Standardní roztoky léčiv o koncentraci 10 a 1 mg/l byly připraveny ředěním zásobního roztoku deionizovanou (DI) vodou, fyziologickým roztokem nebo reálnými matricemi. Fyziologický roztok byl připraven jako roztok 150mM NaCl ze zásobního roztoku o koncentraci 1M NaCl (Pliva-Lachema). Vzorky lidské krve ve formě DBS a vzorky lidské moči byly poskytnuty dobrovolníky z Ústavu analytické chemie AV ČR, v. v. i.. Vzorky DBS byly skladovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a chráněny před světlem. Vzorky moči byly vždy analyzovány pouze v den odběru bez nutnosti uchování.

3.1.4 Ostatní roztoky

Pro mikroextrakce byl použit roztok 10mM HCl, který byl připraven ředěním zásobního 1M roztoku HCl. Zásobní roztok HCl byl připraven ředěním koncentrované HCl (Pliva-Lachema) DI vodou. Roztoky NaOH o koncentracích 10 a 100 mM byly připravené ředěním zásobního 1M roztoku NaOH, který byl připraven rozpuštěním pelet čistého NaOH (Lach-Ner, ČR) v DI vodě. Pro impregnaci PVDF membrány extrakční jednotky byly použity roztoky 1-etyl-2-nitrobenzenu (ENB; Fluka) a dihexyleteru (DHE; Fluka). Všechny chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

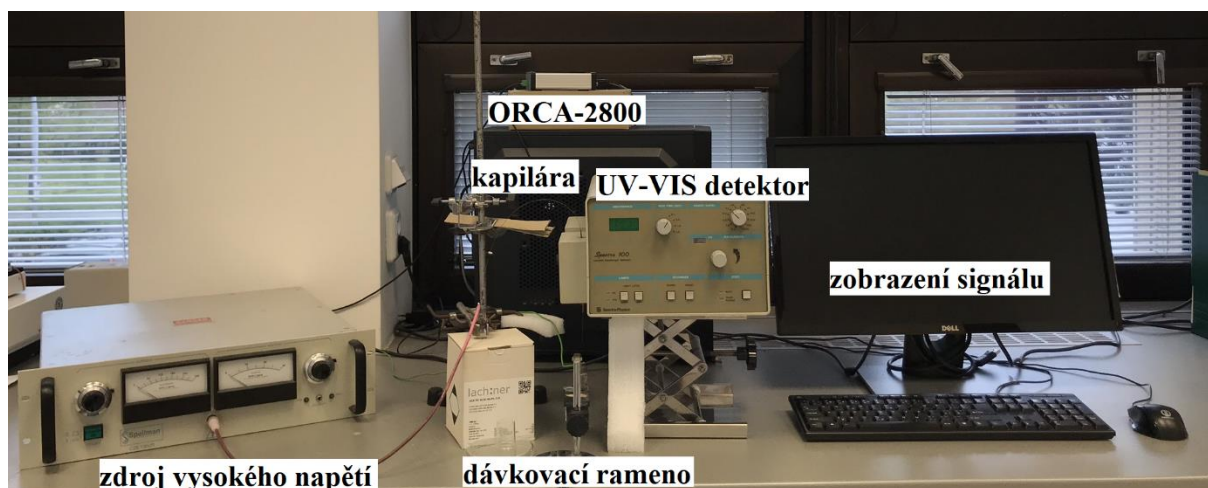
3.2 Elektroforetický systém

Pro separaci vybraných bazických léčiv sloužila laboratorní sestava CE-UV (viz Obr. 9). Kapilára sloužící pro separaci analytů byla vyrobena z křemenného skla pokrytého vrstvou polyimidu (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, U.S.A.). Vnitřní průměr kapiláry byl 75 μm , vnější průměr 375 μm . Celková délka kapiláry byla 55 cm, z čehož 10 cm představovalo efektivní separační část. Před prvním použitím byla kapilára promyta 5 minut 1M roztokem NaOH, následně promyta DI vodou po dobu 5 minut a na závěr promyta BGE po dobu 5 minut. Mezi jednotlivými CE analýzami byla kapilára vždy promyta 1 minutu roztokem BGE.

Na konci každého dne byla kapilára promyta DI vodou po dobu 1 minuty a následně 5 minut profukována vzduchem.

Dávkování vzorku bylo uskutečněno hydrodynamicky – rozdílem hladin vialek obsahujících vzorek a BGE. Vialka se vzorkem byla umístěna v pohyblivém rameni, kterým bylo možné vialku pozvednout takovým způsobem, aby se dávkovací konec kapiláry jemně dotkl membrány a byl v kontaktu s roztokem akceptoru. Následně byla vialka s BGE snížena o 10 cm po dobu 20 vteřin. Po uplynutí času dávkování byly vialky opět umístěny do stejné výšky, a dávkovací konec kapiláry byl vrácen do nádoby s BGE.

Detekce léčiv probíhala na absorpčním UV-VIS detektoru (Spectra 100, Spectra Physics, Santa Clara, CA, U.S.A.) při vlnové délce 200 nm. Separační napětí bylo do systému dodáno zdrojem vysokého napětí (Spellman CZE1000R, Start Spellman, Pulborough, UK) nastaveného na -18 kV. Napětí bylo vloženo na elektrodu umístěnou do výstupní vialky s BGE. Sběr dat byl uskutečněn pomocí dvoukanálového analogově digitálního převodníku ORCA-2800 s LAN rozhraním (Ecom, Praha, ČR). Převodník sloužící ke sběru dat byl připojen k PC se softwarem Ecomac (ECOM spol. s.r.o., ČR), pro další zpracování dat byl použit program Clarity (DataApex, ČR).



Obr. 9: Laboratorní sestava CE s UV-VIS detektorem.

3.3 Zařízení a postupy pro SLM

Extrakční jednotky byly získány manuálním odřezáním jednotlivých extrakčních jednotek ze základní filtrační desky MultiScreen[®] HTS (Merck, Darmstadt, Německo) obsahující 96 jamek (extrakčních jednotek) s hydrofobní PVDF membránou tak, aby bylo možné provést pouze jednu extrakci v čase. Každá extrakční jednotka byla použita pouze jednou. Membrána jednotky byla impregnována 2 μ l organického rozpouštědla (směs ENB a DHE v poměru 1:1), což je minimální objem nutný k nasycení membrány rozpouštědlem, čímž byla vytvořena syntetická kapalná membrána. Následně byl do jednotky pipetován roztok akceptoru. Vzhledem k použití pouze jediné extrakční jednotky namísto všech 96 zároveň bylo třeba simulovat prostředí spodní desky s 96 jamkami určenými na vzorky. K tomuto účelu sloužily vialky o průměru 11,6 mm a výšce 31 mm, do kterých byla po pipetování roztoku donoru extrakční jednotka umístěna, aby došlo ke kontaktu roztoku donoru s membránou a mohla probíhat mikroextrakce. Schéma mikroextrakční jednotky ve vialce s roztoky je na Obr. 8-A.

Po proběhnutí extrakce standardního roztoku či reálných vzorků přes SLM je roztok akceptoru dávkován do kapiláry z povrchu membrány, viz Obr. 8-B.

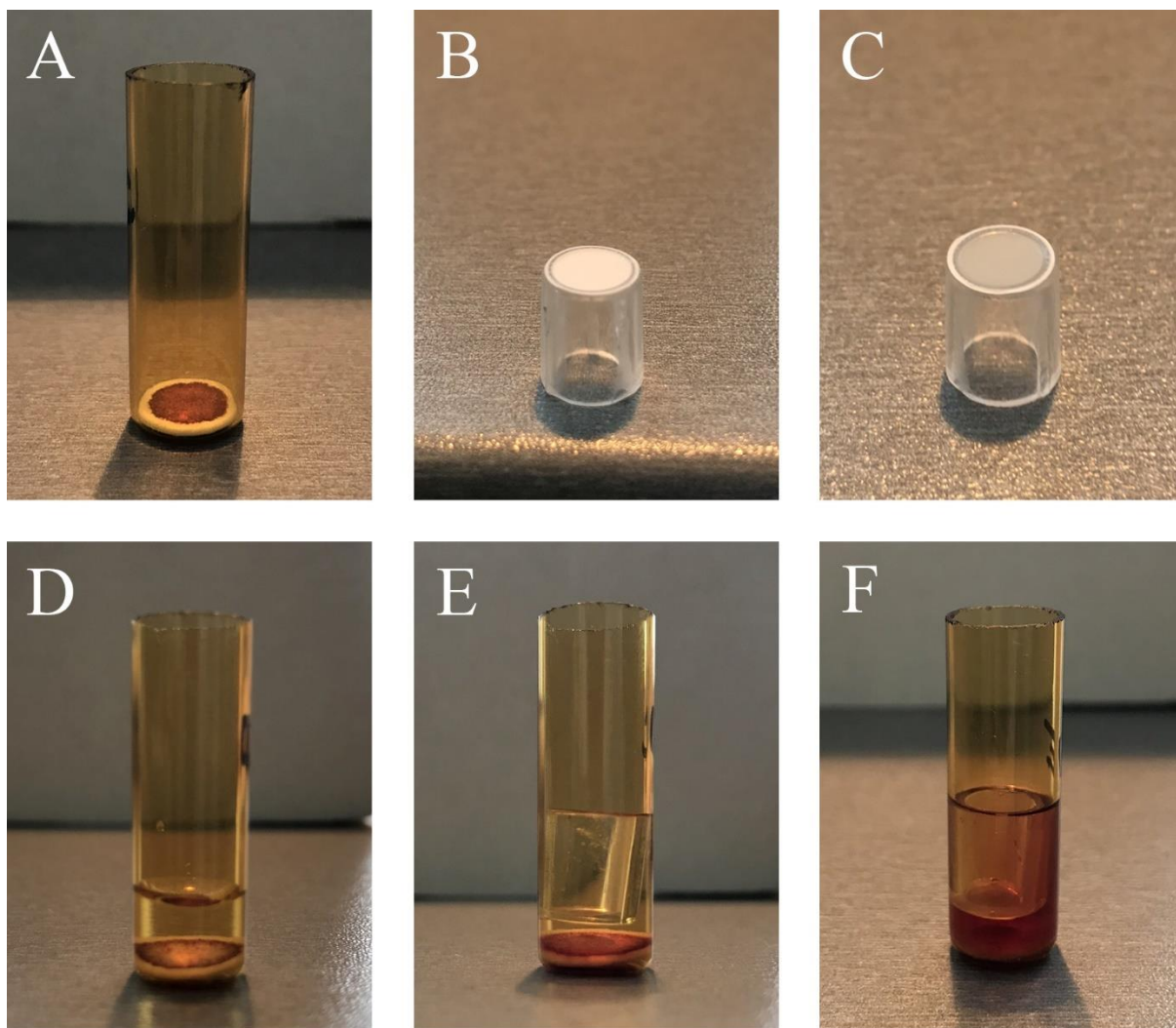
3.3.1 Extrakce reálné matrice přes SLM

V případě extrakcí analytů z fyziologického roztoku či moči, které se přirozeně vyskytují ve vodné fázi, je možné jejich přímé pipetování do vialky pro mikroextrakci bez nutnosti ředění vzorku.

V případě extrakce analytů z DBS je nutné postupovat dle následujícího postupu. Po prohřátí, desinfekci a oschnutí místa odběru byl učiněn vpich bezpečnostní lancetou do bříška prstu. První kapka krve byla setřena sterilní gázou. Pro eliminaci vlivu hematokritu byla po provedení vpichu lancetou krev odebrána (popř. smíchána ve vialce se zásobním roztokem léčiv o potřebné koncentraci) a na vzorkovací papír bylo pipetováno 20 μ l vzorku (viz Obr. 10-B). Celý vzorek krve ve formě DBS o průměru 9,5 mm byl ze vzorkovacího papíru vyříznut korkovrtem (Obr. 10-A) a pinzetou vložen na dno vzorkovací vialky (Obr. 11-A). Jedna mikroextrakční jednotka byla odřezána ze základní filtrační desky s 96 jednotkami (Obr. 11-B) a PVDF membrána byla impregnována 2 μ l směsí organických rozpouštědel (Obr. 11-C). Nasycení membrány rozpouštědlem je indikováno její transparentností. Po impregnaci membrány byl do vialky k DBS pipetován eluční roztok (Obr. 11-D). Extrakční jednotka je poté vložena do roztoku donoru, a je do ní pipetován roztok akceptoru (Obr. 11-E). Od této chvíle byla měřena doba extrakce. Vialka byla uzavřena víčkem pro zamezení odpařování vzorku a umístěna na třepačku, kde byla po celou dobu extrakce. Po proběhnutí eluce krve z DBS do donoru a následné extrakce analytů do SLM a roztoku akceptoru jsou extrahované analyty dávkovány přímo z povrchu membrány.



Obr. 10: Vzorkovací kartička pro DBS. (A) Vyříznutá DBS o průměru 9,5 mm. (B) Vzorky DBS aplikované pipetou do vyznačených míst na vzorkovacím papíře.



Obr. 11: Postup extrakce DBS. (A) DBS vložená na dno vzorkovací vialky. (B) Extrakční jednotka. (C) Impregnace PVDF membrány. (D) Eluční roztok pipetovaný k DBS. (E) Extrakční jednotka s roztokem akceptoru vložená do roztoku donoru. (F) Ukázka vzorku eluované krve z DBS do roztoku donoru (čas extrakce 60 minut).

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Optimalizace podmínek mikroextrakce analytů z fyziologického roztoku

Pro simulaci prostředí reálných matic a optimalizaci podmínek mikroextrakce modelových analytů přes SLM byl zvolen jako donor 150mM fyziologický roztok. Optimalizovaná metoda byla následně aplikována pro extrakci analytů z moči a DBS (viz kapitola 4.2).

4.1.1 Optimalizace složení organické fáze pro impregnaci PVDF membrány

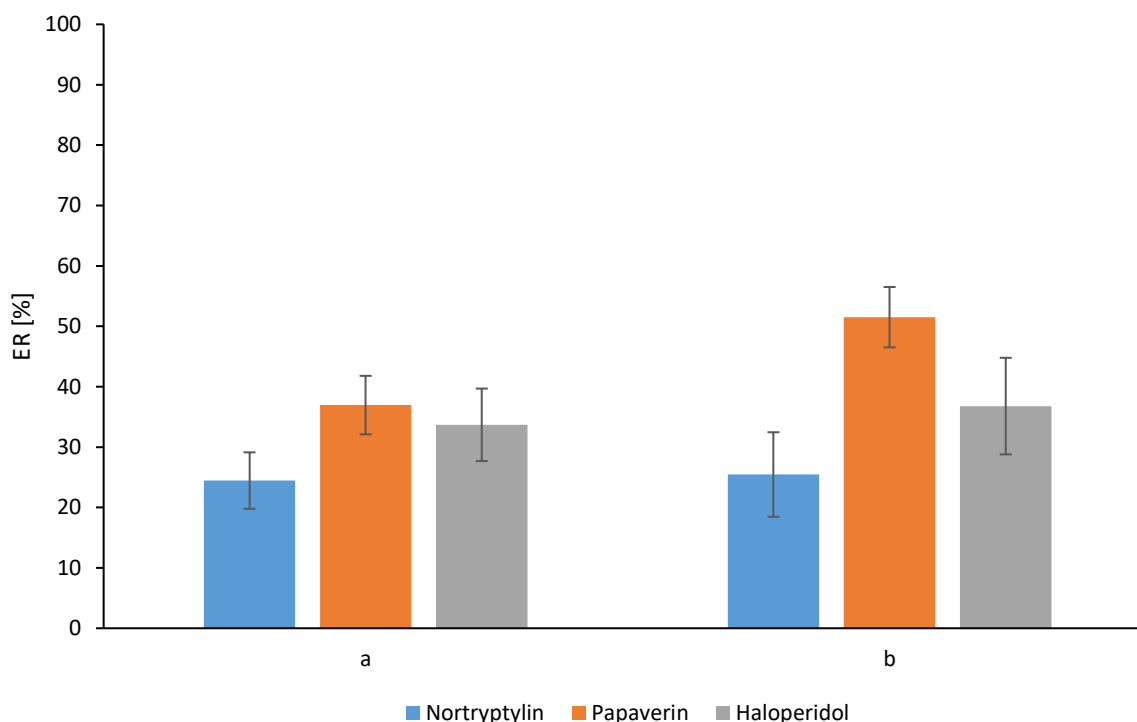
Prvotně bylo optimalizováno složení organické fáze, použité k impregnaci PVDF membrány extrakční jednotky, z důvodu dosažení co nejvyšší extrakční účinnosti. Procentuálně vyjádřená hodnota extrakční výtěžnosti (ER) je vypočtena dle rovnice (6):

$$ER = \frac{n_a}{n_d} \cdot 100 = \frac{V_a}{V_d} \cdot \frac{c_a}{c_d} \cdot 100 \quad (6)$$

kde n_a je molární množství analytu přeneseného do akceptoru, n_d je molární množství analytu v roztoku donoru, V_a je objem roztoku akceptoru, V_d je objem roztoku donoru, c_a je finální koncentrace analytů v roztoku akceptoru po proběhnutí extrakce a c_d je počáteční koncentrace analytů v roztoku donoru před započítáním extrakce.

Jako roztok donoru bylo použito 400 μ l fyziologického roztoku obsahující bazická léčiva (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 10 mg/l. Koncentrace 10 mg/l, která je značně vyšší než běžné terapeutické koncentrace léčiv (viz Tab. 1), byla zvolena pro počáteční experimenty z důvodu zřetelné vizuální detekce. Akceptorem byla 10mM HCl o objemu 40 μ l, která dle předchozích publikací [15] navýšila hodnotu ER mikroextrakce. Bylo předpokládáno, že pro vytvoření příznivého pH gradientu k dosažení vyšší hodnoty ER je vhodná alkalizace roztoku donoru. Donor byl proto alkalizován 100mM NaOH a jeho vliv na hodnotu ER byl dále optimalizován v kapitole 4.1.4. Dávkování extraktu obsahujícího bazická léčiva (nortriptylin, papaverin, haloperidol) probíhalo z povrchu SLM v in-line uspořádání s CE. Extrakce byla prováděna po dobu 23 minut. Čas extrakce byl dále optimalizován v kapitole 4.1.5. Po dobu trvání mikroextrakce byla vialka s mikroextrakční jednotkou umístěna na třepačku, kde probíhala agitace vzorku z důvodu urychlení procesu mikroextrakce. Jako počáteční frekvence agitace bylo zvoleno 1000 rpm. Frekvence agitace byla dále optimalizována v kapitole 4.1.2.

PVDF membrána byla pro porovnání vlivu na hodnotu ER impregnována 2 μ l 1-ethyl-2-nitrobenzenu (ENB) nebo směsí ENB s dihexyletherem (DHE) v poměru 1:1. Jak je patrné z Obr. 12, při použití směsi ENB:DHE v poměru 1:1 bylo dosaženo vyšší hodnoty ER (v případě nortriptylinu bylo dosaženo až o 15 % vyšší ER), než při použití čistého ENB. Všechny následující experimenty byly prováděny se směsí ENB:DHE v poměru 1:1 jako organickým rozpouštědlem pro impregnaci PVDF membrány.

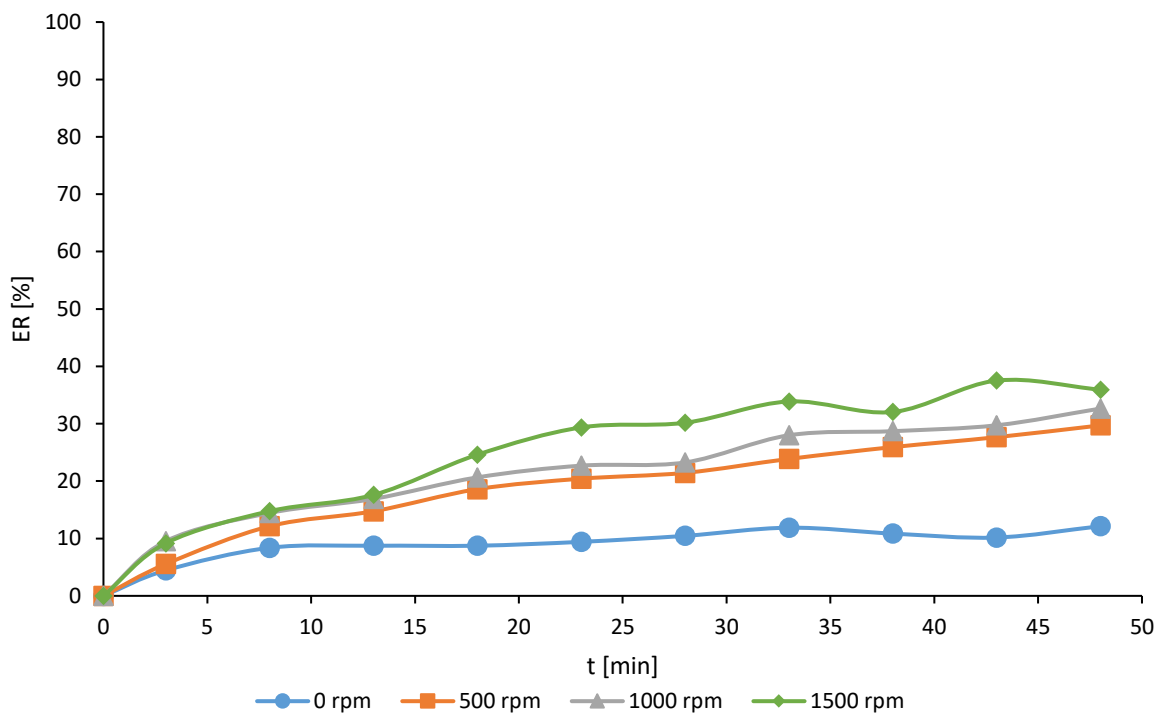


Obr. 12: Vliv organické fáze použité k impregnaci PVDF membrány na výtěžnosti analytů při mikroextrakci ve 23. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze: a – ENB, b – ENB:DHE (poměr 1:1); donor – bazická léčiva 10 mg/l ve 150mM NaCl se 100mM NaOH; akceptor – 10mM HCl.

4.1.2 Časová závislost extrakční výtěžnosti na frekvenci agitace vzorku

Agitace slouží k urychlení difuzního přechodu analytů z roztoku donoru přes membránu. Donorem byl fyziologický roztok alkalizovaný 100mM NaOH s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 10 mg/l a objemu 400 μ l. Akceptorem byla 10mM HCl o objemu 40 μ l. PVDF membrána byla impregnována 2 μ l směsí ENB:DHE v poměru 1:1. Vialky s extrakčními jednotkami byly umístěny do třepačky a pro optimalizaci byla vybrána frekvence otáček 0, 500, 1000 a 1500 rpm. Analyty jsou po extrakci dávkovány z rozhraní membrány a akceptoru.

Pro posouzení vlivu agitace byl měřen časový průběh po dobu 50 minut. V čase 0 byla koncentrace analytů v roztoku akceptoru nulová. Další měření proběhlo ve 3. minutě a následně po 5 minutách. Na Obr. 13 je zobrazen vliv otáček třepačky na časový průběh mikroextrakce papaverinu. Papaverin byl vybrán z důvodu nejvyšší výtěžnosti ze tří použitých modelových analytů. To je způsobeno hodnotou pK_a , kterou má papaverin z vybraných modelových analytů nejnižší. Jako vhodná frekvence otáček byla na základě výsledků vybrána frekvence 1000 rpm, při které došlo k dostatečnému navýšení hodnoty ER (u papaverinu o 13 % ve 23. minutě extrakce. Nepravidelné odchylky v hodnotách ER pro frekvenci 1500 rpm byly způsobeny malou styčnou plochou akceptoru se SLM při tak vysokých otáčkách. Frekvence 1000 rpm byla tedy následně použita pro další měření.



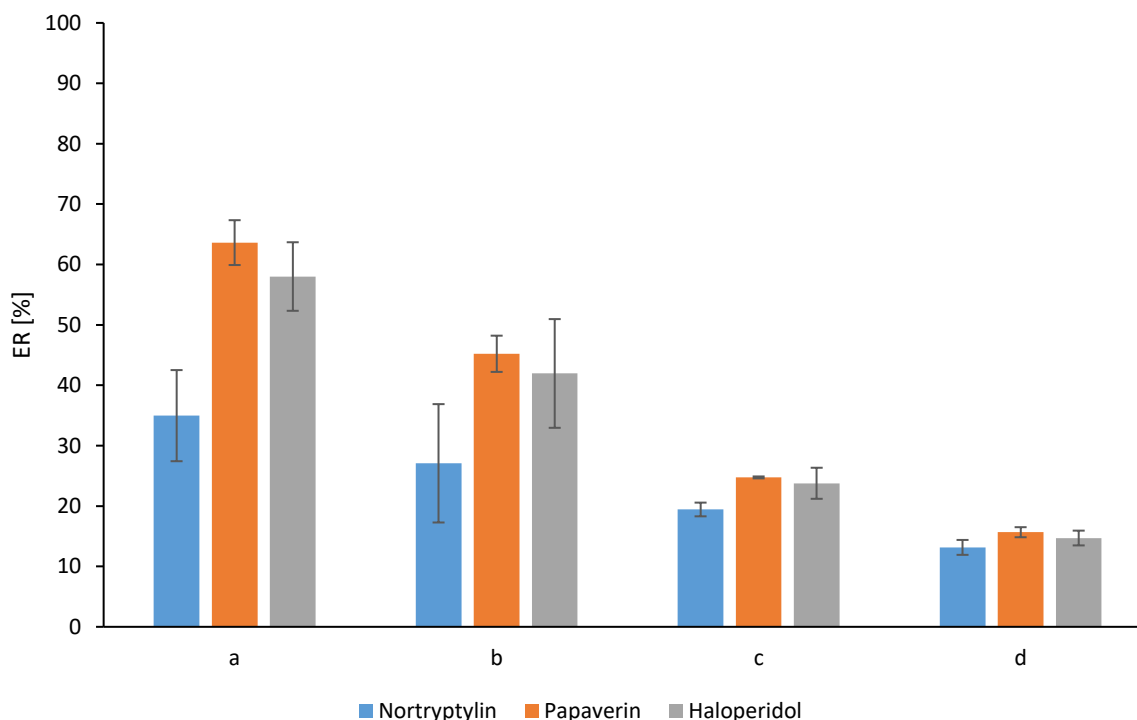
Obr. 13: Časový průběh mikroextrakce papaverinu přes PVDF membránu v závislosti na použitých otáčkách. Extrakční podmínky: organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 10 mg/l ve 150mM NaCl se 100mM NaOH; akceptor – 10mM HCl.

4.1.3 Optimalizace poměru donoru a akceptoru

Extrakce přes SLM poskytuje možnost prekoncentrace analytů ve vzorku pomocí extrakce s různým poměrem roztoků donoru a akceptoru. Pro stanovení ideálních podmínek prekoncentrace analytů byla nejprve provedena série extrakcí se stoupající řadou objemu donoru, zatímco objem akceptoru zůstal konstantní. PVDF membrána extrakční jednotky byla impregnována 2 μ l směsí ENB:DHE v poměru 1:1. V průběhu extrakce byla vialka s extrakční jednotkou umístěna na třepačku o frekvenci 1000 rpm. Analyty byly po extrakci (23 minut) dávkovány z rozhraní membrány a roztoku akceptoru.

Jako donor byl použit fyziologický roztok se 100mM NaOH a bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 10 mg/l. Byly zvoleny čtyři různé objemy donoru: 250, 400, 800 a 1600 μ l. Objem akceptoru (10mM HCl) byl zachován u všech extrakcí konstantní (40 μ l).

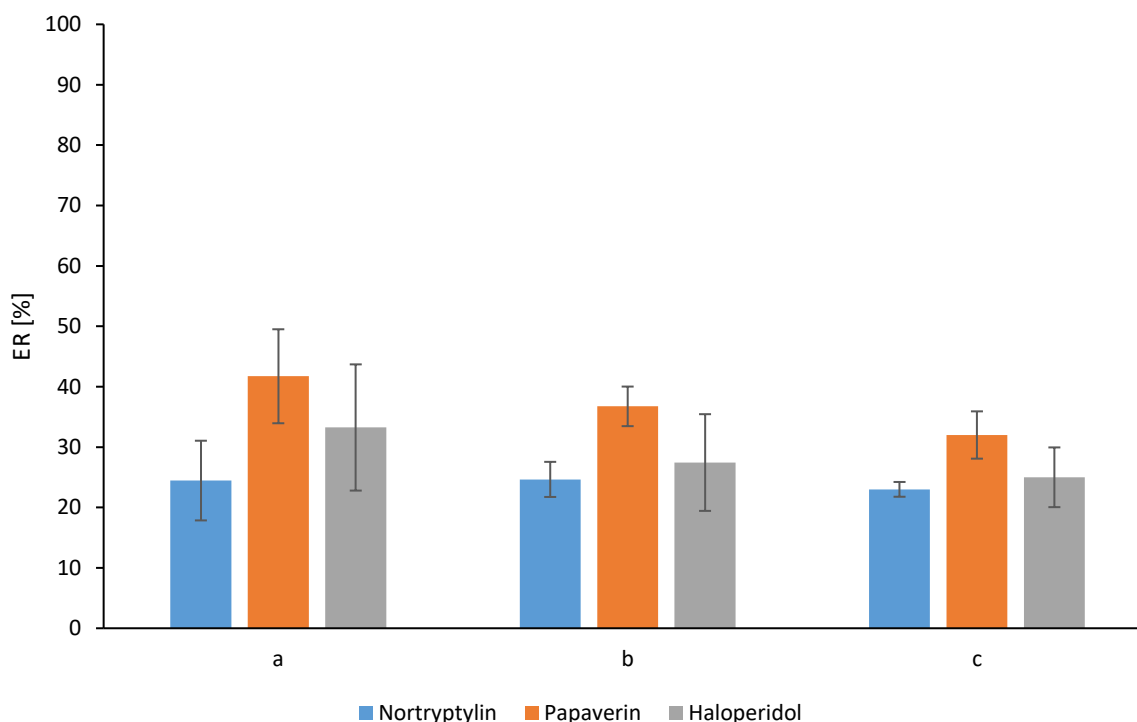
Výsledky extrakcí jsou uvedeny na Obr. 14. Použitím donoru o objemu 250 μl nedochází k dostatečnému zakoncentrování vzhledem k nízkému poměru roztoků donoru a akceptoru. Objem 400 μl byl zvolen jako optimální objem donoru, protože bylo dosaženo dostatečné hodnoty ER a zároveň nejvyššího zakoncentrování analytů. Při použití vyšších objemů donoru (800 a 1600 μl) byla míra prekoncentrace a hodnota ER příliš nízká.



Obr. 14: Vliv poměru donoru a akceptoru na hodnoty ER analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu ve 23. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 10 mg/l ve 150mM NaCl se 100mM NaOH; objem donoru: a – 250 μl , b – 400 μl , c – 800 μl , d – 1600 μl ; akceptor – 10mM HCl (pro vzorky a-d vždy 40 μl).

Následující série extrakcí měla za cíl optimalizaci objemu roztoku akceptoru. Podmínky extrakce zůstaly stejné jako při optimalizaci vhodného objemu donoru (viz kapitola 4.1.3), s tím rozdílem, že v tomto případě zůstal konstantní již optimalizovaný objem donoru (400 μl) a byly zvoleny následující objemy akceptoru: 15, 40 a 200 μl .

Výsledky experimentu jsou na Obr. 15. Nejvyšší hodnoty ER bylo dosaženo v případě použití 15 μl akceptoru. Pro papaverin byla hodnota ER vyšší o 10 % ve srovnání s použitím 200 μl akceptoru. Nejvyšší míry zakoncentrování bylo dosaženo při poměru objemů 400:15 μl , které byly dále použity pro všechny následující analýzy.

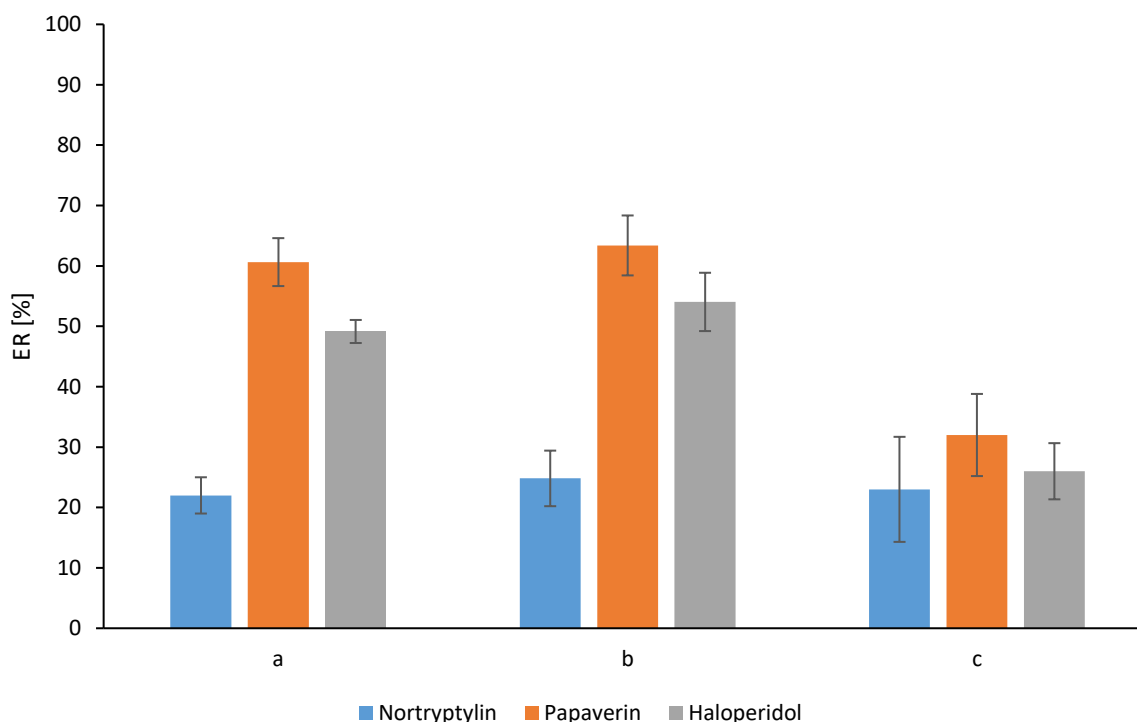


Obr. 15: Vliv poměru donoru a akceptoru na hodnoty ER analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu ve 23. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 10 mg/l ve 150mM NaCl se 100mM NaOH (pro vzorky a-c vždy 400 μ l); akceptor – 10mM HCl (a – 15 μ l, b – 40 μ l, c – 200 μ l).

4.1.4 Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce

Pro stanovení vlivu alkalizace donoru byla provedena série extrakcí, kde byl roztok donoru alkalizován pomocí NaOH o třech různých koncentracích: 0, 10 a 100 mM. Jako donor bylo použito 400 μ l fyziologického roztoku s bazickými léčivými (nortriptylin, papaverin, haloperidol). Koncentrace léčiv v donoru byla snížena z 10 na 1 mg/l. Tato koncentrace je již bližší hodnotám terapeutických koncentrací jednotlivých bazických léčiv (viz Tab. 1). Jako akceptor bylo použito 15 μ l 10mM HCl. K impregnaci PVDF membrány byly použity 2 μ l směsi ENB:DHE v poměru 1:1. Extrakce probíhala za agitace pomocí třepačky o frekvenci 1000 rpm. Čas extrakce byl na základě experimentu provedeného v kapitole 4.1.2 prodloužen na 60 minut v očekávání nárůstu hodnoty ER analytů. Čas extrakce byl dále optimalizován v kapitole 4.1.5.

Bylo předpokládáno, že pH gradient způsobený alkalizací donoru a okyselením akceptoru bude mít za následek získání vyšší hodnoty ER, než v případě neutrálního donoru, což plyne z hodnot pK_a jednotlivých bazických léčiv. Výsledky experimentu jsou na Obr. 16. Mikroextrakce provedené s neutrálním a s alkalizovaným donorem pomocí 10mM NaOH poskytly výrazně vyšší hodnoty ER, než při alkalizaci 100mM NaOH (rozdíl téměř o 30 % papaverinu), což neodpovídá předpokladům z již publikovaných [15] výsledcích extrakcí přes polypropylenovou membránu. V příliš zásaditém prostředí může docházet ke změně vlastností membrány z PVDF materiálu, což má negativní dopad na hodnotu ER a průběh extrakce. Z tohoto důvodu v následujících optimalizacích s fyziologickým roztokem již nebyl roztok donoru alkalizován, čímž bylo dosaženo opakovatelných hodnot ER.

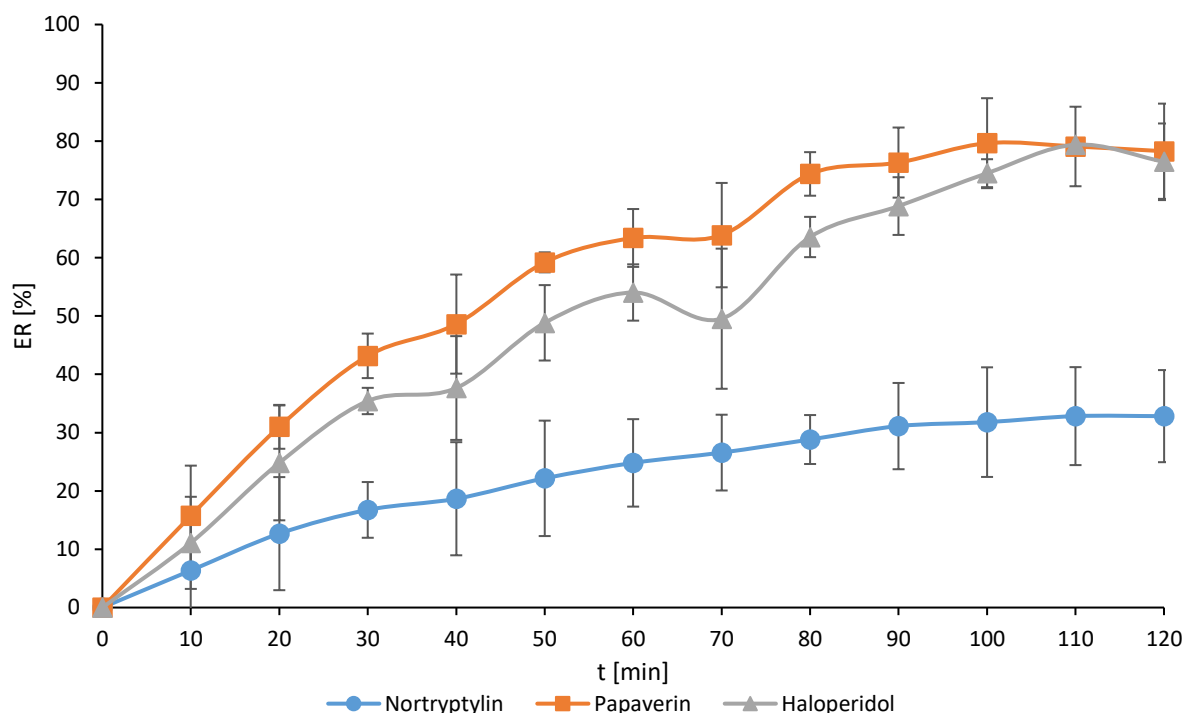


Obr. 16: Vliv koncentrace NaOH v donoru na hodnoty ER při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor: a – bazická léčiva 1 mg/l ve 150mM NaCl (bez NaOH), b – bazická léčiva 1 mg/l ve 150mM NaCl s 10mM NaOH, c – bazická léčiva 1 mg/l ve 150mM NaCl se 100mM NaOH; akceptor: pro vzorky a-c vždy 10mM HCl.

4.1.5 Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek

Pro zjištění časového průběhu mikroextrakce a následný výběr optimálního času mikroextrakce byl akceptor dávkován z povrchu PVDF membrány v pravidelných časových intervalech 10 minut po dobu 120 minut. Pro optimalizaci bylo použito 400 μ l fyziologického roztoku s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 1 mg/l jako donor, akceptorem byla do extrakční jednotky pipetována 10mM HCl o objemu 15 μ l. PVDF membrána oddělující donor a akceptor byla impregnována 2 μ l směsí ENB:DHE v poměru 1:1. Extrakce byla podpořena agitací vialek s extrakčními jednotkami na třepačce o frekvenci 1000 rpm.

Časová závislost mikroextrakce analytů přes PVDF membránu za optimalizovaných podmínek je zobrazena na Obr. 17. V čase 0 minut byl zaznamenán nulový výskyt bazických léčiv v difuzní vrstvě mezi membránou a roztokem akceptoru. Rovnováha se zdánlivě ustálila po 110. minutě, kdy se již extrakční účinnost dále výrazně neměnila. Čas 60 minut byl vybrán jako kompromis mezi dostatečně vysokou extrakční výtěžností (60 % pro papaverin) a časovou náročností experimentu, a proto byly následující experimenty prováděny v 60. minutě extrakce.



Obr. 17: Časový průběh mikroextrakce analytů přes PVDF membránu. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 1 mg/l ve 150 mM NaCl; akceptor – 10mM HCl.

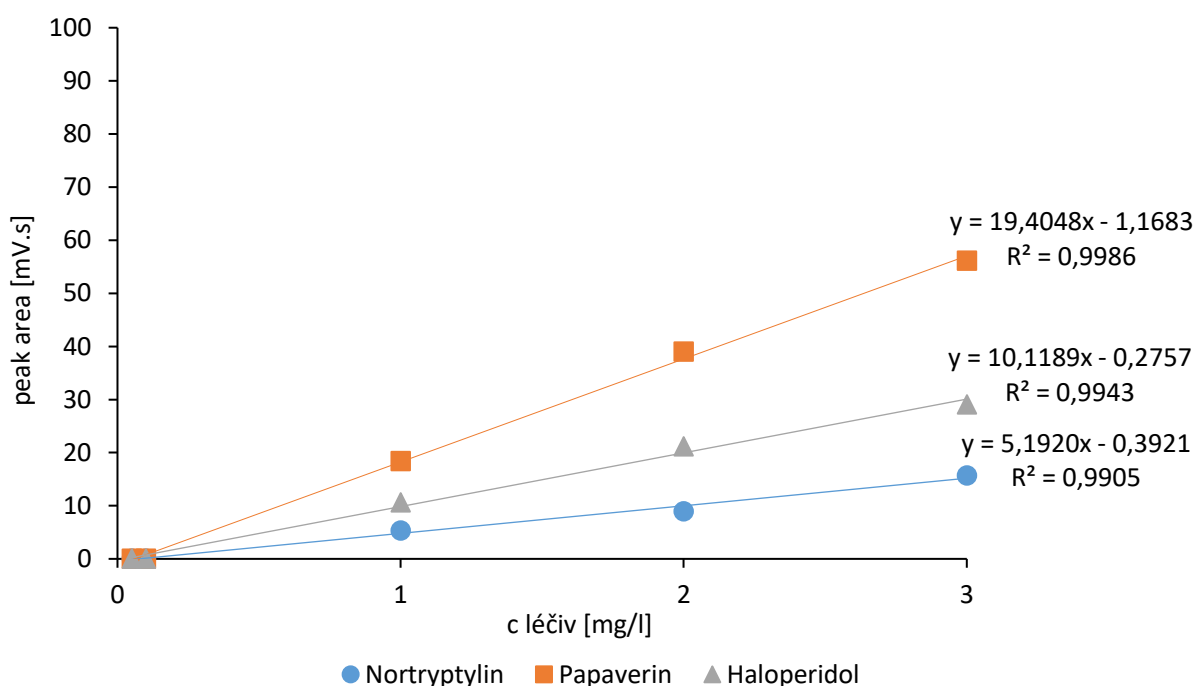
4.1.6 Validace mikroextrakce analytů z fyziologického roztoku

Validace mikroextrakcí bazických léčiv přes SLM membránu extrakční jednotky v in-line spojení s laboratorní CE-UV sestavou probíhal za podmínek optimalizovaných v předchozích experimentech. Jako donor bylo vzato 400 μ l fyziologického roztoku s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o různých koncentracích (0,05–3 mg/l). Akceptor tvořila 10mM HCl o objemu 15 μ l. PVDF membrána oddělující vodné roztoky donoru a akceptoru byla impregnována 2 μ l směsi ENB a DHE v poměru 1:1. Extrakce probíhala po dobu 60 minut. Během doby extrakce byla vialka s extrakční jednotkou umístěna na třepačku o frekvenci agitace 1000 rpm. Po skončení extrakce byl extrakt dávkován z povrchu PVDF membrány do laboratorní sestavy CE-UV při kontaktu membrány s kapilárou.

Hodnoty ER a opakovatelnosti měření (RSD) pro koncentraci 1 mg/l jsou uvedeny v Tab. 2. Tabulka uvádí též hodnotu meze detekce (LOD), definované jako nejnižší koncentrace analytu poskytující analytický signál třikrát vyšší, než je šum základní linie, a hodnotu meze stanovitelnosti (LOQ), definovanou jako nejnižší koncentrace analytu, kterou lze s definovanou přesností kvantitativně stanovit a poskytuje analytický signál desetkrát vyšší, než je šum. Hodnoty ER, RSD, LOD a LOQ jsou vyhodnoceny ze tří po sobě jdoucích měření. Tento způsob vyhodnocení je použit v celé diplomové práci. Kalibrační závislosti pro nortriptylin, papaverin a haloperidol ve fyziologickém roztoku jsou na Obr. 18.

Tab. 2: Validační parametry extrakce analytů přes PVDF membránu v 60. minutě extrakce. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva o různé koncentraci ve 150mM NaCl; akceptor – 10mM HCl; kalibrační rozsah: 0,05–3 mg/l; n=3.

Analyt	ER [%], 1 mg/l	RSD [%], 1 mg/l	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
Nortriptylin	24,8	7,5	0,058	0,194
Papaverin	63,4	5,0	0,022	0,075
Haloperidol	54,0	4,8	0,027	0,089



Obr. 18: Závislost extrakční výtěžnosti analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě na koncentraci analytů v roztoku donoru. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva o různé koncentraci ve 150mM NaCl; akceptor – 10mM HCl.

4.2 Mikroextrakce analytů z reálných vzorků

Podmínky optimalizované pro fyziologický roztok v kapitole 4.1 byly následně aplikovány při extrakcích reálných matric (moč, DBS) přes SLM membránu.

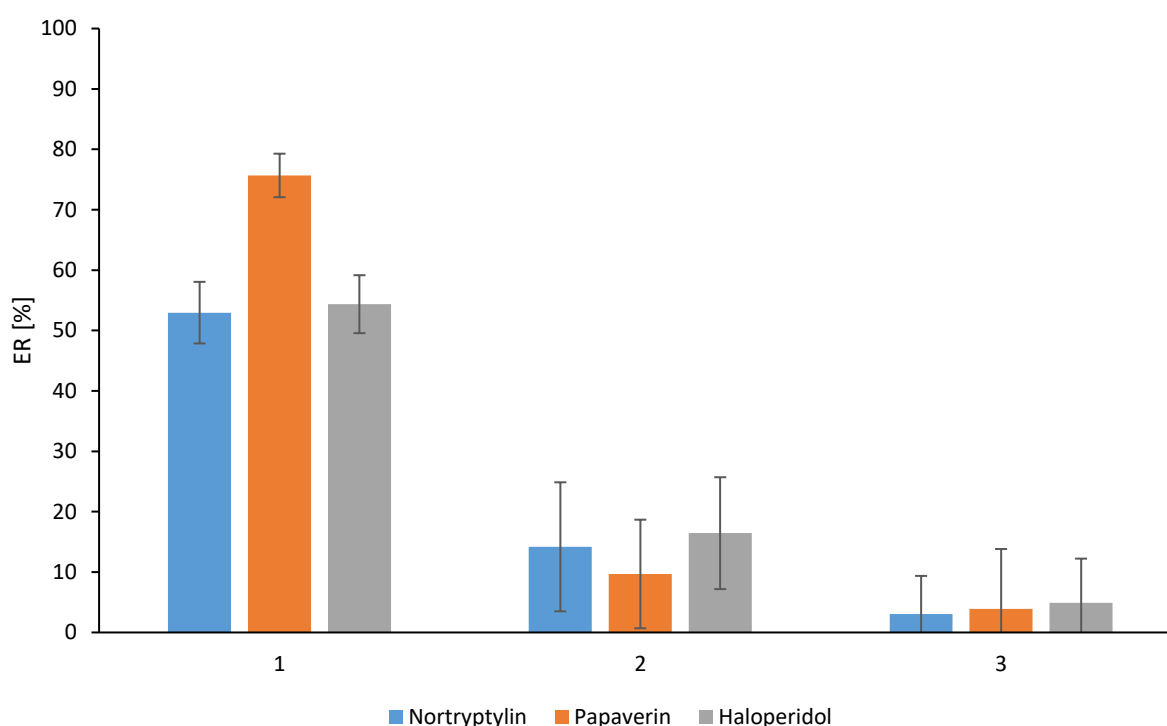
4.2.1 Mikroextrakce analytů z neředěných vzorků lidské moči

4.2.1.1 Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce

Pro ověření, zda dojde u neředěného vzorku lidské moči ke stejnému chování extrakce po alkalizaci roztoku donoru pomocí NaOH jako u fyziologického roztoku (viz kapitola 4.1.4), byla provedena série extrakcí, kde byl roztok donoru alkalizován pomocí NaOH o třech různých koncentracích: 0, 10 a 100 mM. Jako donor bylo vzato 400 μ l neředěného vzorku lidské moči s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 1mg/l. Akceptor tvořila

10mM HCl o objemu 15 μ l. K impregnaci PVDF membrány byly použity 2 μ l směsi ENB:DHE v poměru 1:1. Extrakce probíhala za agitace pomocí třepačky o frekvenci 1000 rpm. Čas extrakce byl 60 minut na základě experimentu provedeného v kapitole 4.1.5. Časový průběh extrakce neředěného vzorku lidské moči byl dále zkoumán v kapitole 4.2.1.2.

Výsledky experimentu jsou na Obr. 19. U provedení extrakce bez alkalizace roztoku donoru byly získány podstatně vyšší hodnoty ER, než v případě neutrálního fyziologického roztoku (viz kapitola 4.1.4). Při alkalizaci donoru 10 a 100mM NaOH pravděpodobně dochází ke změnám vlastností membrány z PVDF materiálu, a v důsledku toho došlo ke změně extrakčních poměrů a k výraznému snížení hodnot ER. Vzhledem k této skutečnosti v následujících optimalizacích s neředěnými vzorky moči již nebyl roztok donoru alkalizován, čímž bylo dosaženo vyšších hodnot ER.

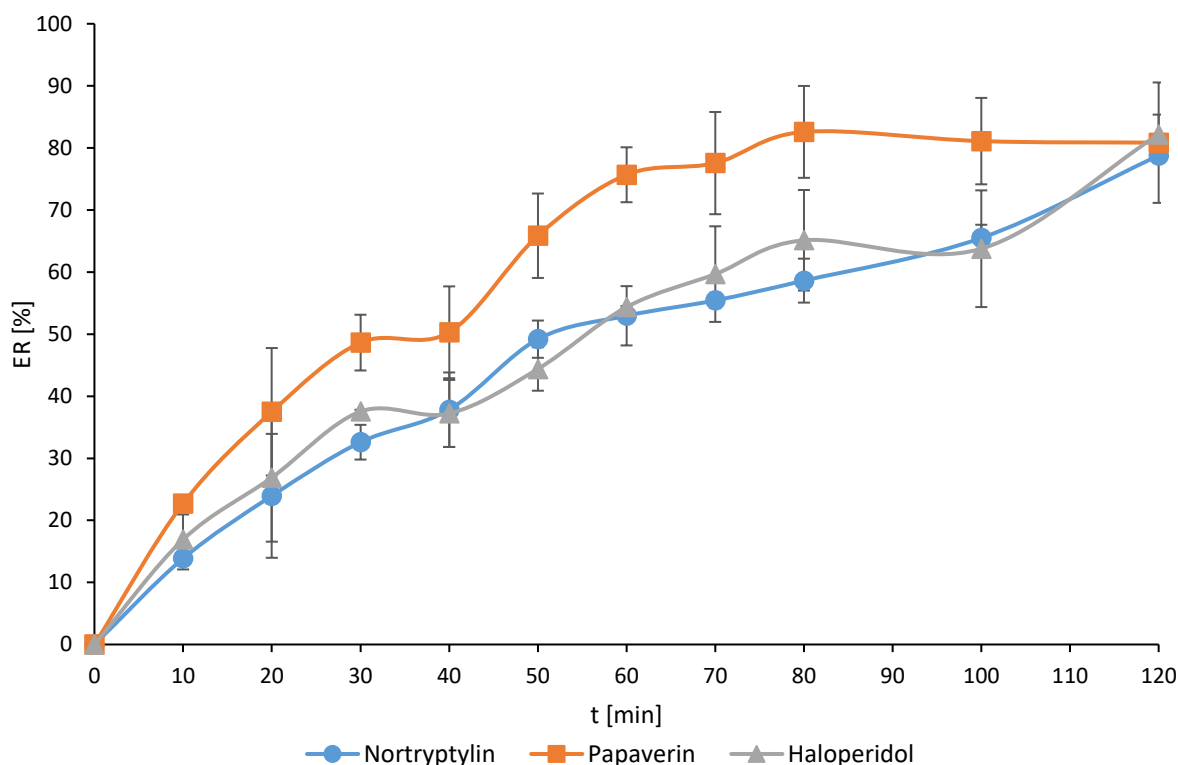


Obr. 19: Vliv koncentrace NaOH v donoru na hodnotu ER při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor: a – bazická léčiva 1 mg/l v lidské moči (bez NaOH), b – bazická léčiva 1 mg/l v lidské moči s 10mM NaOH, c – bazická léčiva 1 mg/l v lidské moči se 100mM NaOH; akceptor: pro vzorky a-c vždy 10mM HCl.

4.2.1.2 Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek

Pro zjištění časového průběhu mikroextrakce a následný výběr optimálního času mikroextrakce byl akceptor dávkován z povrchu PVDF membrány v pravidelných časových intervalech 10 minut po dobu 80 minut a dále v intervalech 20 minut do celkového času extrakce 120 minut pro ověření dosažení rovnováhy a dále neměnných hodnot ER. Pro experiment bylo použito 400 μ l neředěného vzorku lidské moči s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 1 mg/l jako donor, a 15 μ l 10mM HCl jako akceptor. PVDF membrána byla impregnována 2 μ l směsi ENB:DHE v poměru 1:1. Extrakce byla podpořena agitací vialek s extrakčními jednotkami na třepačce o frekvenci 1000 rpm.

Časová závislost mikroextrakce analytů přes PVDF membránu za optimalizovaných podmínek je zobrazena na Obr. 20. V čase 0 minut byl zaznamenán nulový výskyt bazických léčiv v difuzní vrstvě mezi membránou a roztokem akceptoru. Čas 60 minut byl vybrán jako kompromis mezi dostatečně vysokou extrakční výtěžností (75 % pro papaverin) a časovou náročností experimentu, a proto byly následující optimalizace prováděny s touto dobou extrakce.



Obr. 20: Časový průběh mikroextrakce analytů přes PVDF membránu. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 1 mg/l v lidské moči; akceptor – 10mM HCl.

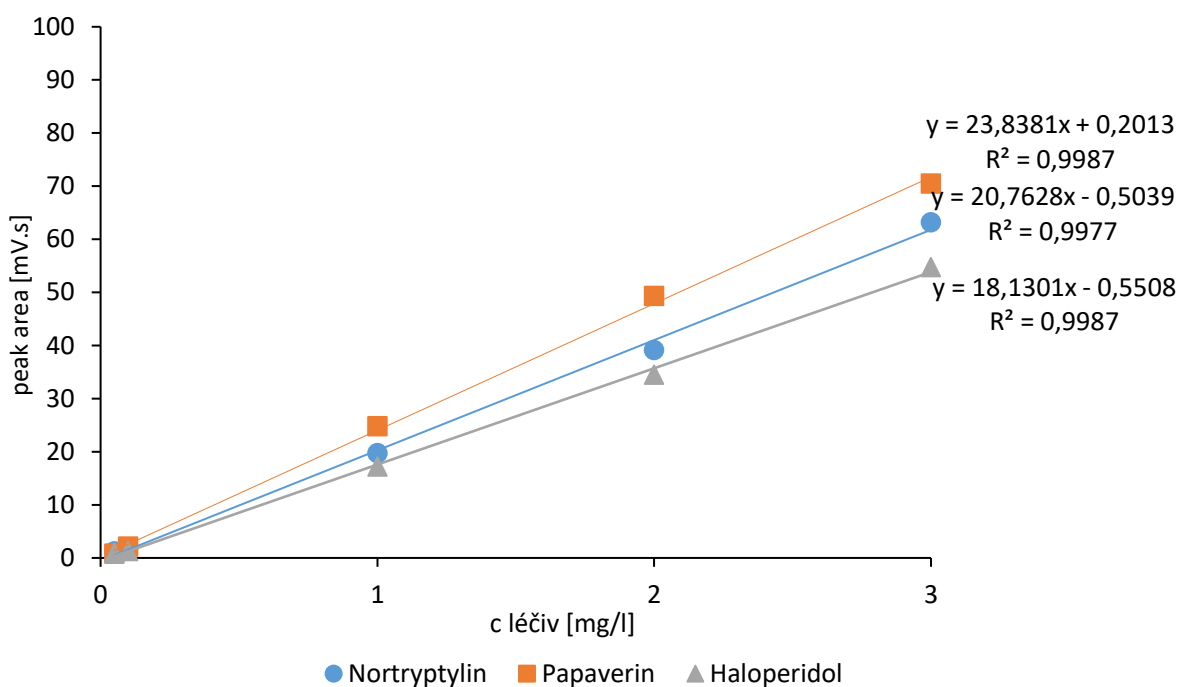
4.2.1.3 Validace mikroextrakce analytů z neředěného vzorku lidské moči

Validace mikroextrakcí bazických léčiv přes SLM membránu extrakční jednotky v in-line spojení s laboratorní CE-UV sestavou probíhal za podmínek optimalizovaných v předchozích experimentech. Jako donor bylo použito 400 μ l neředěné lidské moči s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o různých koncentracích (0,05–3 mg/l). Jako akceptor byla použita 10mM HCl o objemu 15 μ l. PVDF membrána oddělující vodné roztoky donoru a akceptoru byla impregnována 2 μ l směsi ENB a DHE v poměru 1:1. Extrakce probíhala po dobu 60 minut. Během doby extrakce byla vialka s extrakční jednotkou umístěna na třepačku o frekvenci agitace 1000 rpm. Po skončení extrakce byl extrakt dávkován z povrchu PVDF membrány do laboratorní sestavy CE-UV za kontaktu membrány s kapilárou.

Hodnoty ER a RSD pro koncentraci 1 mg/l jsou uvedeny v Tab. 3. Tabulka uvádí též hodnotu LOD a LOQ. Hodnoty ER, RSD, LOD a LOQ byly vyhodnoceny ze tří po sobě jdoucích měření. Kalibrační závislosti pro nortriptylin, papaverin a haloperidol v neředěném vzorku lidské moči jsou na Obr. 21.

Tab. 3: Validační parametry extrakce analytů přes PVDF membránu v 60. minutě extrakce. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva o různé koncentraci v lidské moči; akceptor – 10mM HCl; kalibrační rozsah: 0,05–3 mg/l; n=3.

Analyt	ER [%], 1 mg/l	RSD [%], 1 mg/l	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
Nortriptylin	53,0	4,8	0,027	0,091
Papaverin	75,7	4,4	0,019	0,064
Haloperidol	54,4	0,2	0,027	0,088



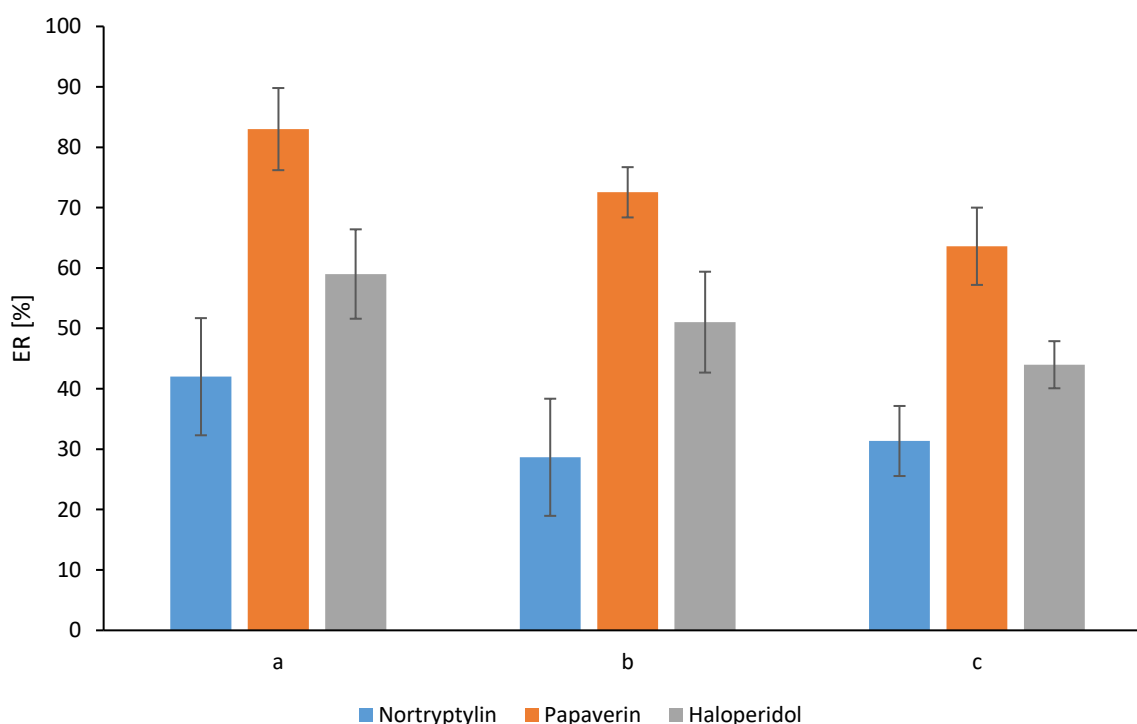
Obr. 21: Závislost výtěžnosti analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě na koncentraci analytů v roztoku donoru. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva v lidské moči o různé koncentraci; akceptor – 10mM HCl.

4.2.2 Mikroextrakce analytů ze vzorků DBS z lidské krve

4.2.2.1 Vliv alkalizace roztoku donoru na účinnost mikroextrakce

Pro ověření, zda dojde u vzorku krve z eluované DBS ke stejnému chování extrakce po alkalizaci roztoku donoru pomocí NaOH jako u fyziologického roztoku a vzorku neředěné lidské moči, byla provedena série extrakcí, kde byl roztok donoru alkalizován pomocí NaOH o třech různých koncentracích: 0, 10 a 100 mM. Roztok donoru představovalo 400 μ l lidské krve z DBS eluované DI vodou s bazickými léčivy (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 1 mg/l. Jako akceptor byla použita 10mM HCl o objemu 15 μ l. K impregnaci PVDF membrány byly použity 2 μ l směsi ENB:DHE v poměru 1:1. Extrakce probíhala za agitace pomocí třepačky o frekvenci 1000 rpm. Čas extrakce byl 60 minut na základě experimentu provedeného v kapitole 4.1.5 a 4.2.1.2. Časový průběh extrakce eluované lidské krve z DBS byl dále zkoumán v kapitole 4.2.2.2.

Výsledky experimentu jsou na Obr. 22. Nejvyšší hodnota ER byla získána při mikroextrakci bez alkalizace roztoku donoru, stejně jako u mikroextrakcí analytů z fyziologického roztoku či neředěných vzorků lidské moči. Hodnota ER klesá s rostoucí koncentrací NaOH použitého k alkalizaci donoru. Nedochozí zde k tak významným změnám hodnot ER jako v předchozích případech u fyziologického roztoku (viz kapitola 4.1.4) a neředěných vzorků lidské moči (viz kapitola 4.2.1.1). I přesto bylo v následujících extrakcích s eluovanou lidskou krví z DBS použit neutrální roztok donoru, čímž bylo dosaženo vyšších hodnot ER.

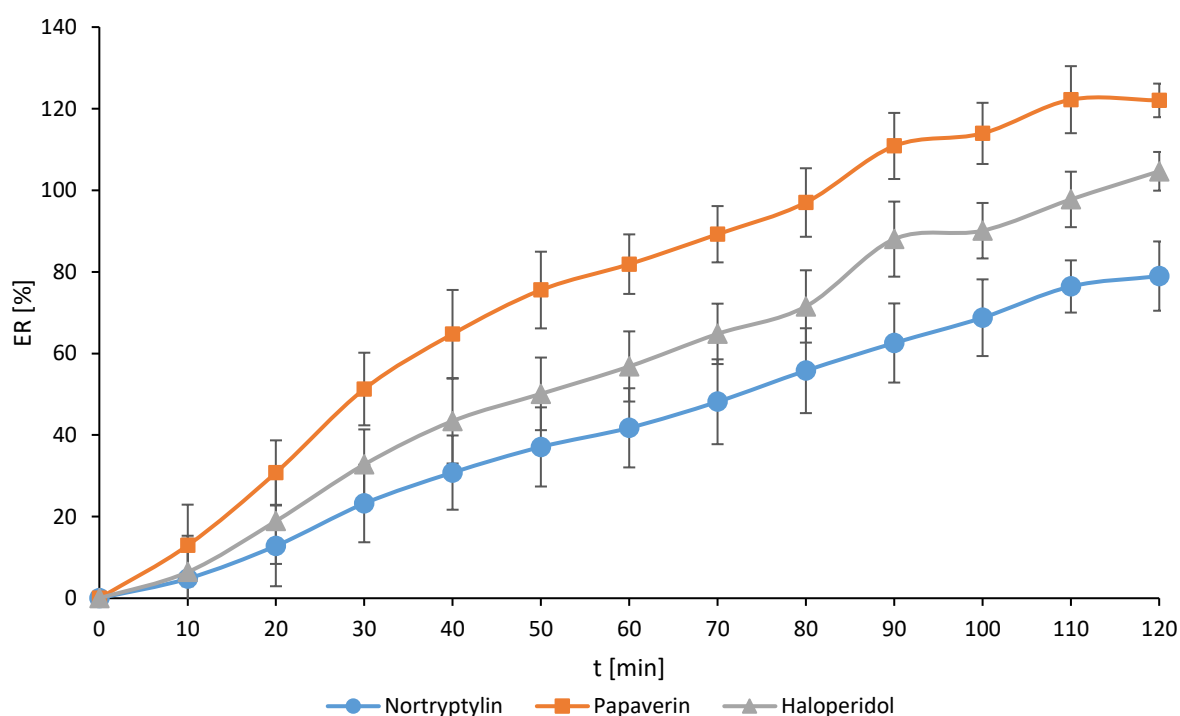


Obr. 22: Vliv koncentrace NaOH v donoru na výtěžnost analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor: a – bazická léčiva 1 mg/l v lidské krvi (bez NaOH), b – bazická léčiva 1 mg/l v lidské krvi s 10mM NaOH, c – bazická léčiva 1 mg/l v lidské krvi se 100mM NaOH; akceptor: pro vzorky a-c vždy 10mM HCl.

4.2.2.2 Časový průběh mikroextrakce za optimalizovaných podmínek

Pro zjištění časového průběhu mikroextrakce a výběr optimálního času mikroextrakce byl akceptor dávkován z povrchu PVDF membrány v pravidelných časových intervalech 10 minut po dobu 120 minut. Objem 400 μ l lidské krve z DBS eluované DI vodou s bazickými léčivými (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o koncentraci 1 mg/l představovalo donor. Jako akceptor byla do extrakční jednotky pipetována 10mM HCl (15 μ l). Objem 2 μ l směsi ENB:DHE v poměru 1:1 byl použit pro impregnaci PVDF membrány. Pro podporu přenosu analytů během extrakce byly vialky s extrakčními jednotkami umístěny na třepačku o frekvenci 1000 rpm.

Časová závislost mikroextrakce analytů přes PVDF membránu za optimalizovaných podmínek je zobrazena na Obr. 23. V čase 0 minut byl zaznamenán nulový výskyt bazických léčiv v difuzní vrstvě mezi membránou a roztokem akceptoru. Ani po uplynutí doby extrakce (120 minut) nedošlo k ustálení rovnováhy, a bylo dosaženo vysokých hodnot ER. To může být mimo jiné způsobeno i tím, že analyty nestíhají difundovat z rozhraní SLM membrány do roztoku akceptoru a dochází k jejich zakoncentrování, což je ovlivněno jak pH gradientem, tak i jejich distribučním koeficientem ($\text{Log } K_{ow}$). Čas 60 minut byl vybrán jako kompromis mezi dostatečně vysokou extrakční výtěžností (82 % pro papaverin) a časovou náročností experimentu, a proto byly následující experimenty prováděny po dobu 60 minut.



Obr. 23: Časový průběh mikroextrakce analytů přes PVDF membránu. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva 1 mg/l v lidské krvi; akceptor – 10mM HCl.

4.2.2.3 Validace mikroextrakce analytů z DBS z lidské krve

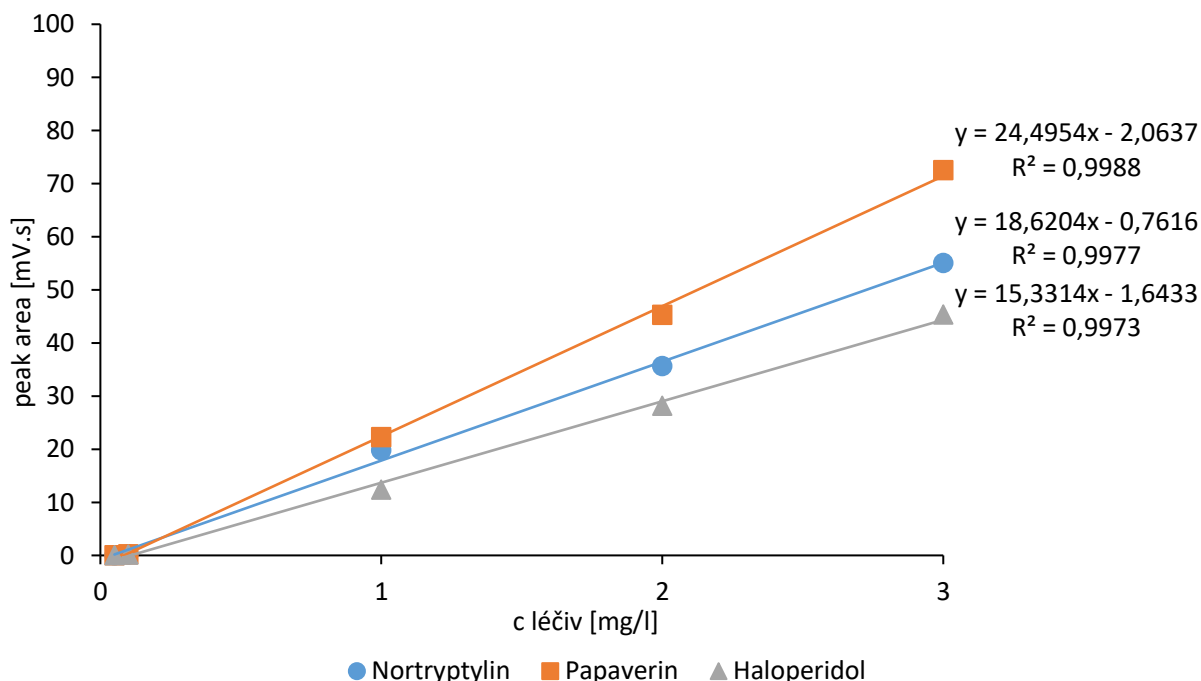
Validace mikroextrakcí bazických léčiv přes SLM membránu extrakční jednotky v in-line spojení s laboratorní CE-UV sestavou probíhal za předem optimalizovaných podmínek (viz kapitola 4.1). Jako donor bylo použito 400 μ l lidské krve z DBS eluované DI vodou

s bazickými léčivými (nortriptylin, papaverin, haloperidol) o různých koncentracích (0,05–3 mg/l). Akceptor představovala 10mM HCl o objemu 15 µl. K impregnaci PVDF membrány oddělující vodné roztoky donoru a akceptoru byla použita směs ENB a DHE v poměru 1:1 o objemu 2 µl. Čas extrakce byl 60 minut. Pro urychlení extrakce byla vialka s extrakční jednotkou umístěna na třepačku o frekvenci agitace 1000 rpm. Po extrakci byl akceptor s extrahovanými analyty dávkován z povrchu PVDF membrány do laboratorní sestavy CE-UV při kontaktu membrány s kapilárou.

Tab. 4 uvádí hodnoty ER a RSD pro koncentraci 1 mg/l. Tabulka uvádí též hodnotu LOD a LOQ. Tyto validační hodnoty jsou vyhodnoceny ze tří po sobě jdoucích měření. Kalibrační závislosti pro nortriptylin, papaverin a haloperidol v lidské krvi eluované DI vodou z DBS jsou na Obr. 24.

Tab. 4: Validační parametry extrakce analytů přes PVDF membránu v 60. minutě extrakce. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva o různé koncentraci v lidské krvi; akceptor – 10mM HCl; kalibrační rozsah: 0,05–3 mg/l; n=3.

Analyt	ER [%], 1 mg/l	RSD [%], 1 mg/l	LOD [mg/l]	LOQ [mg/l]
Nortriptylin	41,8	9,7	0,035	0,115
Papaverin	81,9	7,3	0,018	0,059
Haloperidol	56,9	8,6	0,025	0,084



Obr. 24: Závislost výtěžnosti analytů při mikroextrakci přes PVDF membránu v 60. minutě na koncentraci analytů v roztoku donoru. Extrakční podmínky: třepačka – 1000 rpm; organická fáze – směs ENB:DHE (1:1); donor – bazická léčiva v lidské krvi o různé koncentraci; akceptor – 10mM HCl.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce byl vývoj optimalizované nízkonákladové mikroextrakční techniky pro analýzu a prekoncentraci bazických léčiv v biologických vzorcích. K tomuto účelu byla použita mikroextrakce přes kapalnou membránu ukotvenou na pevném nosiči (SLM) z polyvinylidendifluoridu (PVDF). Schopnost mikroextrakce přes SLM prekoncentrovat analyty a přečistit vzorek byla zkoumána pomocí laboratorní CE soustavy s UV detekcí. CE byla zvolena z důvodu snadného spojení SLM s CE, které umožňuje in-line dávkování extraktu z fázového rozhraní SLM-akceptor přímo do CE separační kapiláry.

Pro počáteční optimalizační experimenty sloužil jako donor fyziologický roztok, který simuloval prostředí reálných vzorků. Po optimalizaci základních podmínek mikroextrakce přes SLM byly další parametry optimalizovány i v prostředí komplexních matic, a to v neřaděných vzorcích lidské moči a lidské krve eluované ze suchých krevních teček. Cílem základní optimalizace bylo stanovení nejvhodnějších podmínek mikroextrakce pro přečištění biologického vzorku a prekoncentrace analytů v akceptorové fázi. Neoptimálnější organická fáze na impregnaci hydrofobní PVDF membrány mikroextrakční jednotky byla zvolena směs ENB a DHE v poměru 1:1 o objemu 2 μ l. Pro snížení časové náročnosti mikroextrakce byla vialka s mikroextrakční jednotkou umístěna na třepačku, s optimální rychlostí třepání 1000 rpm. Jako optimální poměr roztoků donoru a akceptoru pro získání co největší míry prekoncentrace a zároveň zachování dostatečné extrakční výtěžnosti (ER) byly zvoleny objemy 400 μ l roztoku donoru a 15 μ l roztoku akceptoru. Tyto optimalizované podmínky byly následně aplikovány při stanovení vlivu pH donoru na hodnotu ER a zkoumání časového průběhu mikroextrakce fyziologického roztoku i reálných vzorků. Jako optimální se ukázala extrakce roztoku donoru bez alkalizace, což vede ke snížené spotřebě reagentů. Nakonec byl optimalizován čas extrakce, kdy byl jako kompromis mezi časovou náročností mikroextrakce a získání dostatečně vysokých hodnot ER zvolen čas mikroextrakce 60 minut.

Výsledkem této diplomové práce je optimalizovaná analytická metoda, která umožňuje prekoncentraci bazických léčiv z komplexních biologických matic pomocí SLM extrakcí a jejich přímé stanovení pomocí CE. Výhodou této metody je použití levných jednorázových mikroextrakčních jednotek, které jsou komerčně dostupné a jsou tak vhodné například pro analýzy v klinických laboratořích. Vyvinutou extrakční metodu je možno polo-automatizovat a je tak možno provést až 96 mikroextrakcí najednou, což vede k výraznému snížení času potřebného pro jednu extrakci. Další automatizace je možná spojením s komerčními přístroji pro CE, které umožňují automatické dávkování přečištěných vzorků a navíc také užití selektivních a citlivých detektorů (LIF, MS).

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] LIU, Hanghui a Purnendu K. DASGUPTA. Analytical Chemistry in a Drop. Solvent Extraction in a Microdrop. *Analytical Chemistry* [online]. 1996, **68**(11), 1817-1821 [cit. 2019-05-09]. DOI: 10.1021/ac960145h. ISSN 0003-2700.
- [2] AUDUNSSON, Gudjon. Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system. *Analytical Chemistry* [online]. 1986, **58**(13), 2714-2723 [cit. 2019-05-10]. DOI: 10.1021/ac00126a030. ISSN 0003-2700.
- [3] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Direct coupling of supported liquid membranes to capillary electrophoresis for analysis of complex samples: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2013, **787**, 10-23 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.065. ISSN 00032670.
- [4] SILVA, Catarina, Carina CAVACO, Rosa PERESTRELO, Jorge PEREIRA a José CÂMARA. Microextraction by Packed Sorbent (MEPS) and Solid-Phase Microextraction (SPME) as Sample Preparation Procedures for the Metabolomic Profiling of Urine. *Metabolites* [online]. 2014, **4**(1), 71-97 [cit. 2019-04-25]. DOI: 10.3390/metabo4010071. ISSN 2218-1989.
- [5] WU, Jianhai, Hongbo ZHAO, Ming DU, Liang SONG a Xianbing XU. Dispersive liquid–liquid microextraction for rapid and inexpensive determination of tetramethylpyrazine in vinegar. *Food Chemistry* [online]. 2019, **286**, 141-145 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.01.159. ISSN 03088146.
- [6] DELLA-FLORA, A., R. WIELENS BECKER, S. FREDERIGI BENASSI, et al. Comprehensive investigation of pesticides in Brazilian surface water by high resolution mass spectrometry screening and gas chromatography–mass spectrometry quantitative analysis. *Science of The Total Environment* [online]. 2019, **669**, 248-257 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.02.354. ISSN 00489697.
- [7] LIU, Feng-Jie, Chuan-Ting LIU, Wei LI a An-Na TANG. Dispersive solid-phase microextraction and capillary electrophoresis separation of food colorants in beverages using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as both extractant and pseudostationary phase. *Talanta* [online]. 2015, **132**, 366-372 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.09.014. ISSN 00399140.
- [8] MOREDA-PIÑEIRO, Jorge a Antonio MOREDA-PIÑEIRO. Recent Advances in the Combination of Assisted Extraction Techniques. *Green Extraction Techniques - Principles, Advances and Applications* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 519-573 [cit. 2019-04-30]. Comprehensive Analytical Chemistry. DOI: 10.1016/bs.coac.2016.12.002. ISBN 9780128110829.
- [9] MOREDA-PIÑEIRO, Jorge a Antonio MOREDA-PIÑEIRO. Recent Advances in the Combination of Assisted Extraction Techniques. *Green Extraction Techniques - Principles, Advances and Applications* [online]. Elsevier, 2017, 2017, 519-573 [cit. 2019-04-27]. Comprehensive Analytical Chemistry. DOI: 10.1016/bs.coac.2016.12.002. ISBN 9780128110829.

- [10] QUINTANA, José Benito, Rosario RODIL a Thorsten REEMTSMA. Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects. *Journal of Chromatography A* [online]. 2004, **1061**(1), 19-26 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/j.chroma.2004.10.090. ISSN 00219673.
- [11] RASMUSSEN, Knut Einar a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2004, **23**(1), 1-10 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/S0165-9936(04)00105-0. ISSN 01659936.
- [12] PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a Knut Einar RASMUSSEN. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid–liquid extraction. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1184**(1-2), 132-142 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.08.088. ISSN 00219673.
- [13] LEE, Jingyi, Hian Kee LEE, Knut E. RASMUSSEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2008, **624**(2), 253-268 [cit. 2019-04-17]. DOI: 10.1016/j.aca.2008.06.050. ISSN 00032670.
- [14] SAN ROMÁN, M. F., E. BRINGAS, R. IBÁÑEZ a I. ORTIZ. Liquid membrane technology: fundamentals and review of its applications. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online] [online]. 2010, **85**(1), 2-10 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1002/jctb.2252. ISSN 02682575.
- [15] RYŠAVÁ, Lenka, Miloš DVORÁK a Pavel KUBÁŇ. The effect of membrane thickness on supported liquid membrane extractions in-line coupled to capillary electrophoresis for analyses of complex samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2019 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.02.067. ISSN 00219673.
- [16] PANTŮČKOVÁ, Pavla a Pavel KUBÁŇ. In-line coupling of supported liquid membrane extraction to capillary electrophoresis for simultaneous analysis of basic and acidic drugs in urine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1519**, 137-144 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.084. ISSN 00219673.
- [17] ESKANDARI, Mahboube, Yadollah YAMINI, Lida FOTOUHI a Shahram SEIDI. Microextraction of mebendazole across supported liquid membrane forced by pH gradient and electrical field. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2011, **54**(5), 1173-1179 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.jpba.2010.12.006. ISSN 07317085.
- [18] GJELSTAD, Astrid, Knut Einar RASMUSSEN, Marthe Petrine PARMER a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Parallel artificial liquid membrane extraction: micro-scale liquid–liquid–liquid extraction in the 96-well format. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(11), 1377-1385 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.4155/bio.13.59. ISSN 1757-6180.
- [19] TROST, L.C. a J.J. LEMASTERS. A Cytotoxicity Assay for Tumor Necrosis Factor Employing a Multiwell Fluorescence Scanner. *Analytical Biochemistry* [online]. 1994, **220**(1), 149-153 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1006/abio.1994.1311. ISSN 00032697.

- [20] DAYEH, Vivian R., Sherri GROMINSKY, Stephanie J. DEWITTE-ORR, Dana SOTORNIK, Christine R. YEUNG, Lucy E.J. LEE, Denis H. LYNN a Niels C. BOLS. Comparing a ciliate and a fish cell line for their sensitivity to several classes of toxicants by the novel application of multiwell filter plates to Tetrahymena. *Research in Microbiology* [online]. 2005, **156**(1), 93-103 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.resmic.2004.08.005. ISSN 09232508.
- [21] JAKOBSEN, Stine Mjåvatn, Hege KERSTEN a Espen MOLDEN. Evaluation of Brain Anticholinergic Activities of Urinary Spasmolytic Drugs Using a High-Throughput Radio Receptor Bioassay. *Journal of the American Geriatrics Society* [online]. 2011, **59**(3), 501-505 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1111/j.1532-5415.2010.03307.x. ISSN 00028614.
- [22] SCHWIRZER, Siegfried M.G., Andrea M. HOFMAIER, Antonius KETTRUP, Per E. NERDINGER, Karl-Werner SCHRAMM, Heinz THOMA, Martin WEGENKE a Friedrich J. WIEBEL. Establishment of a Simple Cleanup Procedure and Bioassay for Determining 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Toxicity Equivalents of Environmental Samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety* [online]. 1998, **41**(1), 77-82 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1006/eesa.1998.1670. ISSN 01476513.
- [23] MultiScreen® Plates. *Merck KGaA* [online]. Darmstadt, Germany, 2019 [cit. 2019-04-28]. Dostupné z: <http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/cell-culture-systems/cell-growth/multiscreen/u2ab.qB.5JoAAAFBYchb3.rZ.nav>
- [24] OLSEN, Katharina Norgren, Kristine Skoglund ASK, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Parallel artificial liquid membrane extraction of psychoactive analytes: a novel approach in therapeutic drug monitoring. *Bioanalysis* [online]. 2018, **10**(6), 385-395 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.4155/bio-2017-0250. ISSN 1757-6180.
- [25] UR REHMAN, Hanif, Gul AKHTAR, Haroon UR RASHID, Nauman ALI, Imtiaz AHMAD, Saeed UR REHMAN, Kamin KHAN a Muhammad ARSHAD. Transport of Zn (II) by TDDA-Polypropylene Supported Liquid Membranes and Recovery from Waste Discharge Liquor of Galvanizing Plant of Zn (II). *Journal of Chemistry* [online]. 2017, **2017**, 1-9 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1155/2017/7569354. ISSN 2090-9063.
- [26] JEAN, E., D. VILLEMEN, M. HLAIBI a L. LEBRUN. Heavy metal ions extraction using new supported liquid membranes containing ionic liquid as carrier. *Separation and Purification Technology*[online]. 2018, 1978, **201**, 1-9 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.seppur.2018.02.033. ISSN 13835866.
- [27] SEIDI, Shahram, Leila ALAVI, Ali JABBARI a Maryam SHANEHSAZ. Three-phase carrier-mediated hollow fiber microextraction based on deep eutectic solvent followed by HPLC–UV for determination of raloxifene and ethinylestradiol in pharmaceutical wastewater treatment plants. *Journal of the Iranian Chemical Society* [online]. 2019, **16**(5), 1007-1018 [cit. 2019-04-20]. DOI: 10.1007/s13738-018-01572-4. ISSN 1735-207X.
- [28] HUANG, Chuixiu, Astrid GJELSTAD, Knut Fredrik SEIP, Henrik JENSEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Exhaustive and stable electromembrane extraction of acidic drugs from human plasma. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, **1425**, 81-87 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.11.052. ISSN 00219673.

- [29] GJELSTAD, Astrid, Knut Einar RASMUSSEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Electromembrane extraction of basic drugs from untreated human plasma and whole blood under physiological pH conditions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2009, **393**(3), 921-928 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1007/s00216-008-2344-x. ISSN 1618-2642.
- [30] HASHEMINASAB, Kobra Sadat, Ali Reza FAKHARI, Abolfath SHAHSAVANI a Hamid AHMAR. A new method for the enhancement of electromembrane extraction efficiency using carbon nanotube reinforced hollow fiber for the determination of acidic drugs in spiked plasma, urine, breast milk and wastewater samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, **1285**, 1-6 [cit. 2019-04-28]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.01.115. ISSN 00219673.
- [31] ASK, Kristine Skoglund, Turgay BARDAKCI, Marthe Petrine PARMER, Trine Grønhaug HALVORSEN, Elisabeth Leere ØIESTAD, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Parallel artificial liquid membrane extraction as an efficient tool for removal of phospholipids from human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **129**, 229-236 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.07.011. ISSN 07317085.
- [32] PILAŘOVÁ, Veronika, Mumtaz SULTANI, Kristine Skoglund ASK, Lucie NOVÁKOVÁ, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. One-step extraction of polar drugs from plasma by parallel artificial liquid membrane extraction. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, **1043**, 25-32 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.09.019. ISSN 15700232.
- [33] ROLDÁN-PIJUÁN, Mercedes, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Parallel artificial liquid membrane extraction of acidic drugs from human plasma. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(10), 2811-2819 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1007/s00216-015-8505-9. ISSN 1618-2642.
- [34] VÅRDAL, Linda, Hilde-Merete ASKILDSSEN, Astrid GJELSTAD, Elisabeth Leere ØIESTAD, Hilde Marie Erøy EDVARDESEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Parallel artificial liquid membrane extraction of new psychoactive substances in plasma and whole blood. *Journal of Chromatography B* [online]. 2017, **1048**, 77-84 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2017.02.010. ISSN 15700232.
- [35] VÅRDAL, Linda, Gladys WONG, Åse Marit Leere ØIESTAD, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Astrid GJELSTAD a Elisabeth Leere ØIESTAD. Rapid determination of designer benzodiazepines, benzodiazepines, and Z-hypnotics in whole blood using parallel artificial liquid membrane extraction and UHPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2018, **410**(20), 4967-4978 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1007/s00216-018-1147-y. ISSN 1618-2642.
- [36] ASK, Kristine Skoglund, Elisabeth Leere ØIESTAD, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Dried blood spots and parallel artificial liquid membrane extraction—A simple combination of microsampling and microextraction. *Analytica Chimica Acta* [online]. 2018, **1009**, 56-64 [cit. 2019-04-21]. DOI: 10.1016/j.aca.2018.01.024. ISSN 00032670.

- [37] ROSZKOWSKA, Anna, Natalia MIĘKUS a Tomasz BĄCZEK. Application of solid-phase microextraction in current biomedical research. *Journal of Separation Science* [online]. 2019, **42**(1), 285-302 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1002/jssc.201800785. ISSN 16159306.
- [38] BOUATRA, Souhaila, Farid AZIAT, Rupasri MANDAL, et al. The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* [online]. 2013, **8**(9) [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1371/journal.pone.0073076. ISSN 1932-6203.
- [39] KUBÁŇ, Petr, Pavol ĎURČ, Miroslava BITTOVÁ a František FORET. Separation of oxalate, formate and glycolate in human body fluid samples by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. *Journal of Chromatography A* [online]. 2014, **1325**, 241-246 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.12.039. ISSN 00219673.
- [40] PANTŮČKOVÁ, Pavla a Pavel KUBÁŇ. In-line coupling of supported liquid membrane extraction to capillary electrophoresis for simultaneous analysis of basic and acidic drugs in urine. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1519**, 137-144 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.084. ISSN 00219673.
- [41] EDELBROEK, Peter M, Jacques van der HEIJDEN a Leo M L STOLK. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. *Therapeutic Drug Monitoring* [online]. 2009, **31**(3), 327-336 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1097/FTD.0b013e31819e91ce. ISSN 0163-4356.
- [42] LI, Wenkui a Francis L. S. TSE. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomedical Chromatography* [online]. 2010, **24**(1), 49-65 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1002/bmc.1367. ISSN 02693879.
- [43] BLUMENFELD, T. A., W. G. HERTELENDY a S. H. FORD. Simultaneously obtained skin-puncture serum, skin-puncture plasma, and venous serum compared, and effects of warming the skin before puncture. *Clinical Chemistry* [online]. 1977, **23**(9), 1705-1710 [cit. 2019-04-23].
- [44] MEITES, S. Skin-puncture and blood-collecting technique for infants: update and problems. *Clinical Chemistry*. 1988, **34**(9), 1890-1894. ISSN 0009-9147.
- [45] KUPKE, I.R., B. KATHER a S. ZEUGNER. On the composition of capillary and venous blood serum. *Clinica Chimica Acta* [online]. 1981, **112**(2), 177-185 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1016/0009-8981(81)90376-4. ISSN 00098981.
- [46] HENION, Jack, Regina V OLIVEIRA a Donald H CHACE. Microsample analyses via DBS: challenges and opportunities. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(20), 2547-2565 [cit. 2019-05-03]. DOI: 10.4155/bio.13.197. ISSN 1757-6180.
- [47] MEESTERS, Roland JW a Gero P HOOFF. State-of-the-art dried blood spot analysis: an overview of recent advances and future trends. *Bioanalysis* [online]. 2013, **5**(17), 2187-2208 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.4155/bio.13.175. ISSN 1757-6180.

- [48] MEESTERS, Roland JW, Jamie ZHANG, Nick A VAN HUIZEN, Gero P HOOFF, Rob A GRUTERS a Theo M LUIDER. Dried matrix on paper disks: the next generation DBS microsampling technique for managing the hematocrit effect in DBS analysis. *Bioanalysis* [online]. 2012, **4**(16), 2027-2035 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.4155/bio.12.175. ISSN 1757-6180.
- [49] O'MARA, M, B HUDSON-CURTIS, K OLSON, Y YUEH, J DUNN a N SPOONER. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis* [online]. 2011, **3**(20), 2335-2347 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.4155/bio.11.220. ISSN 1757-6180.
- [50] ROWLAND, Malcolm a Gary T. EMMONS. Use of Dried Blood Spots in Drug Development: Pharmacokinetic Considerations. *The AAPS Journal*[online]. 2010, **12**(3), 290-93 [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1208/s12248-010-9188-y. ISSN 1550-7416.
- [51] GIORDANO, P. C. Newborn Screening for Hemoglobinopathies Using Capillary Electrophoresis. *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis* [online]. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, 2013-7-26, , 131-145 [cit. 2019-04-30]. Methods in Molecular Biology. DOI: 10.1007/978-1-62703-029-8_13. ISBN 978-1-62703-028-1.
- [52] GUTHRIE, Robert a Ada SUSI. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics* [online]. 1963, **32**(3), 338-343 [cit. 2019-04-30].
- [53] BERTASO, Anna, Daniela SORIO, Anthula VANDOROS, Elio F. DE PALO, Federica BORTOLOTTI a Franco TAGLIARO. Use of finger-prick dried blood spots (fpDBS) and capillary electrophoresis for carbohydrate deficient transferrin (CDT) screening in forensic toxicology. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2016, **37**(21), 2867-2874 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1002/elps.201500588. ISSN 01730835.
- [54] FALLER, Andrea, Barbara RICHTER, Matthias KLUGE, et al. LC-MS/MS analysis of phosphatidylethanol in dried blood spots versus conventional blood specimens. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **401**(4), 1163-1166 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1007/s00216-011-5221-y. ISSN 1618-2642.
- [55] STIBLER, Helena a Birgitta CEDERBERG. Diagnosis of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome by analysis of transferrin in filter paper blood spots. *Acta Paediatrica*[online]. 1993, **82**(1), 55-59 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1111/j.1651-2227.1993.tb12517.x. ISSN 0803-5253.
- [56] SULOCHANA, Suresh P., Prasanthi DARAM, Nuggehally R. SRINIVAS a Ramesh MULLANGI. Review of DBS methods as a quantitative tool for anticancer drugs. *Biomedical Chromatography* [online]. 2019, **33**(1) [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1002/bmc.4445. ISSN 02693879.
- [57] ENDERLE, Yeliz, Kathrin FOERSTER a Jürgen BURHENNE. Clinical feasibility of dried blood spots: Analytics, validation, and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2016, **130**, 231-243 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1016/j.jpba.2016.06.026. ISSN 07317085.

- [58] SARACINO, Maria A., Maria C. CATAPANO, Rosa IEZZI, Lorenzo SOMAINI, Gilberto GERRA a Laura MERCOLINI. Analysis of γ -hydroxy butyrate by combining capillary electrophoresis-indirect detection and wall dynamic coating: application to dried matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407**(29), 8893-8901 [cit. 2019-04-30]. DOI: 10.1007/s00216-015-9051-1. ISSN 1618-2642.
- [59] PASCHKE, A. Consideration of the physicochemical properties of sample matrices – an important step in sampling and sample preparation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, **22**(2), 78-89 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00206-1. ISSN 01659936.
- [60] DÍAZ-CRUZ, M.Silvia, María J. LÓPEZ DE ALDA a Damià BARCELÓ. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2003, **22**(6), 340-351 [cit. 2019-05-08]. DOI: 10.1016/S0165-9936(03)00603-4. ISSN 01659936.
- [61] SCHULZ, Martin, Stefanie IWERSEN-BERGMANN, Hilke ANDRESEN a Achim SCHMOLDT. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care* [online]. 2012, **16**(4) [cit. 2019-04-29]. DOI: 10.1186/cc11441. ISSN 1364-8535.
- [62] KIM, Sunghwan, Jie CHEN, Tiejun CHENG, et al. PubChem 2019 update: improved access to chemical data. *Nucleic Acids Research* [online]. 2019, 47(D1), D1102-D1109 [cit. 2019-04-23]. DOI: 10.1093/nar/gky1033. ISSN 0305-1048.
- [63] PERUZZO, Pablo J., D. J. G. MARINO, Eduardo A. CASTRO a Andrey A. TOROPOV. QSPR Modeling of Lipophilicity by Means of Correlation Weights of Local Graph Invariants. *Internet Electronic Journal of Molecular Design*. **2003**, 334-347. ISSN 1538-6414.
- [64] LI, S. F. Y. *Capillary Electrophoresis, Volume 52 1st Edition*. 1. USA: Elsevier Science, 1992. ISBN 9780444815903.
- [65] ALTRIA, K. D. a C. F. SIMPSON. High voltage capillary zone electrophoresis: Operating parameters effects on electroosmotic flows and electrophoretic mobilities. *Chromatographia* [online]. 1987, **24**(1), 527-532 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1007/BF02688539. ISSN 0009-5893.
- [66] High Performance Capillary Electrophoresis: A primer. Second completely revised edition. Henk H. Lauer a Gerard P. Rozing (ed.). Germany: Agilent Technologies, 2009. Č. publikace 5990-3777EN.
- [67] FUGUET, E., C. RÀFOLS, E. BOSCH a M. ROSÉS. Buffered Background Electrolytes for Capillary Electrophoresis. *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* [online]. Elsevier, 2015, 2015, , 1-9 [cit. 2019-05-07]. DOI: 10.1016/B978-0-12-409547-2.11551-3. ISBN 9780124095472.
- [68] MUZA, Michelle M. a James P. LANDERS, MEYERS, Robert A., ed. Capillary Electrophoresis of Proteins and Glycoproteins. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* [online]. 2006 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1002/9780470027318.a1605.

- [69] LANDERS, James P. *Handbook of capillary electrophoresis*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1997. ISBN 08-493-2498-X.
- [70] ROSE, Donald J. a James W. JORGENSEN. Characterization and automation of sample introduction methods for capillary zone electrophoresis. *Analytical Chemistry* [online]. 2002, **60**(7), 642-648 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1021/ac00158a008. ISSN 0003-2700.
- [71] JACKSON, P.E. a P.R. HADDAD. Optimization of injection technique in capillary ion electrophoresis for the determination of trace level anions in environmental samples. *Journal of Chromatography A* [online]. 1993, **640**(1-2), 481-487 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/0021-9673(93)80218-W. ISSN 00219673.
- [72] BHARTI MITTU, Ashish Chauhan a Priyanka CHAUHAN. *Analytical Method Development and Validation: A Concise Review* [online]. 2015, **06**(01) [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.4172/2155-9872.1000233. ISSN 21559872.
- [73] ARAUJO, Pedro. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of Chromatography B* [online]. 2009, **877**(23), 2224-2234 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.jchromb.2008.09.030. ISSN 15700232.
- [74] ŠEVČÍK, Jiří Georg Kamil. *Metodologie měření v analytické chemii*. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-718-4271-0.
- [75] ALMEDA, S., L. ARCE a M. VALCARCEL. The More and Less Common Approaches to Enhancing Sensitivity in Capillary Electrophoresis. *Current Analytical Chemistry* [online]. 2010, **6**(2), 126-143 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.2174/157341110790945508. ISSN 15734110.
- [76] PANTŮČKOVÁ, Pavla, Pavel KUBÁŇ a Petr BOČEK. A simple sample pretreatment device with supported liquid membrane for direct injection of untreated body fluids and in-line coupling to a commercial CE instrument. *ELECTROPHORESIS* [online]. 2013, **34**(2), 289-296 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1002/elps.201200369. ISSN 01730835.
- [77] ARCE, L., L. NOZAL, B.M. SIMONET, M. VALCÁRCEL a A. RÍOS. Liquid-phase microextraction techniques for simplifying sample treatment in capillary electrophoresis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2009, **28**(7), 842-853 [cit. 2019-05-02]. DOI: 10.1016/j.trac.2009.02.016. ISSN 01659936.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AV ČR	akademie věd České republiky
BGE	základní elektrolyt (background electrolyte)
CE	kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis)
CE-UV	kapilární elektroforéza s UV detekcí (capillary electrophoresis with UV-detection)
DBS	suché krevní tečky (dried blood spots)
DHE	dihexyleter
DI H ₂ O	deionizovaná voda
DLLME	disperzní mikroextrakce typu kapalina-kapalina (dispersive liquid-liquid microextraction)
EME	elektromembránová extrakce (electromembrane extraction)
ENB	1-etyl-2-nitrobenzen
EOF	elektroosmotický tok (electroosmotic flow)
ER	extrakční výtěžnost (extraction recovery)
FSSLM	kapalná membrána zakotvená na plochem nosiči (flat sheet supported liquid membrane)
HF-LPME	mikroextrakce přes duté vlákno (hollow fibre microextraction)
HFSLM	kapalná membrána zakotvená v nosiči z dutých vláken (hollow fibre supported liquid membrane)
HPLC	vysoce účinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
LAN	lokální síť (local area network)
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography with tandem-mass spectrometry)
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LLE	extrakce typu kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction)
LOD	mez detekce (limit of detection)
LOQ	mez stanovitelnosti (limit of quantification)
MS	hmotnostní spektrometrie

PALME	paralelní extrakce se syntetickou kapalnou membránou (parallel artificial liquid membrane extraction)
PP	polypropylen
PTFE	polytetrafluoretylen
PVDF	polyvinylidendifluorid
SDME	mikroextrakce jednou kapkou (single drop microextraction)
SLM	kapalná membrána zakotvená na pevném nosiči (supported liquid membrane)
SPE	extrakce na pevné fázi (solid phase extraction)
UHPLC-MS	ultra vysoce účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (ultra-high performance liquid chromatography with mass spectrometry)
UV	ultrafialové záření (ultraviolet)
VIS	viditelné záření (visible)