

# Ekstrakcija čvrstom fazom primjena u bioanalitici

---

**Mornar, Ana; Nigović, Biljana; Amidžić Klarić, Daniela; Jeličić, Mario-Livio; Brusač, Edvin**

Source / Izvornik: **Farmaceutski glasnik, 2020, 76, 353 - 394**

**Journal article, Published version**

**Rad u časopisu, Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:038799>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



# Ekstrakcija čvrstom fazom – primjena u bioanalitici

ANA MORNAR, BILJANA NIGOVIĆ, DANIELA AMIDŽIĆ KLARIĆ,  
MARIO-LIVIO JELIČIĆ, EDVIN BRUSAČ

Sveučilište u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijski fakultet,  
Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb

## Uvod

Pod pojmom »bioanalitika« obuhvaćene se kvalitativne i kvantitativne analize lijekova, metabolita te biomarkera u biološkim uzorcima poput pune krvi, seruma, plazme, urina, tkiva, kose, sline i sl. Tijekom posljednjih 20 godina bioanalitika se značajno razvila te se pred bioanalitičara stavljaju zahtjevi za razvojem brzih metoda analize endobiotika i ksenobiotika u složenim biološkim matricama s visokom razinom pouzdanosti. Ovakav izvanredan napredak omogućen je prvenstveno razvojem naprednih analitičkih tehnika koje omogućavaju brze, precizne i točne analize. Među ovim tehnikama najvažnije mjesto zauzimaju vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (LC/MS)<sup>1</sup>, vezani sustav tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti i masene spektrometrije (UHPLC/MS)<sup>2</sup> te vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije (GC/MS)<sup>3</sup>. Složeni biološki uzorci, koji često uz analit sadrže niz drugih sastavnica poput stanica, proteina, lipida, lipoproteina, ugljikohidrata, soli, kiselina i baza, mogu umanjiti i selektivnost i

<sup>1</sup> LC/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i masene spektrometrije, (engl. *High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)

<sup>2</sup> UHPLC/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i masene spektrometrije, (engl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)

<sup>3</sup> GC/MS – vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije, (engl. *Gas Chromatography coupled with Mass Spectrometry*)

osjetljivost bioanalize te uzrokovati i oštećenje analitičkog instrumenta. Stoga je moguće zaključiti kako je priprema biološkog uzorka u smislu uklanjanja interferencija i ukoncentriravanja analita, koji je nerijetko prisutan u tragovima, ključan korak bioanalitičkih metoda. Premda je tijekom posljednjih godina razvijen niz tehnika pripreme uzoraka koje omogućavaju uklanjanje interferencija poput proteina, lipida i soli, ali i selektivnu ekstrakciju analita, još uvijek učinkovita priprema uzorka oduzima i do 80 % vremena bioanalitičaru te je ujedno i najčešći izvor pogrešaka cjelokupnog bioanalitičkog postupka.

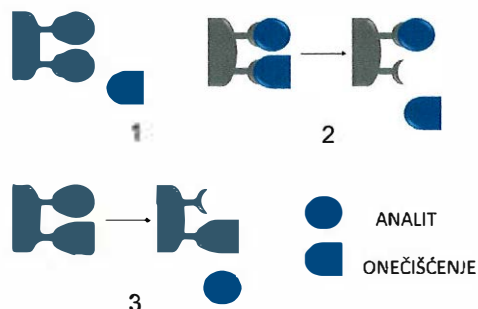
Među najčešće korištene tehnike pripreme uzoraka u bioanalitici ubraja se ekstrakcija čvrstom fazom koja se iznimno razvija posljednjih godina u smislu pojave novih inovativnih vrsta reaktivnih sorbensa kao i modifikacija tehnike u smislu automatizacije te poboljšanja ekološke prihvatljivosti (1). Ukoliko se prikladno optimiziraju uvjeti ekstrakcije, ovom tehnikom je moguće postići uspješno uklanjanje soli, proteina i lipida iz bioloških uzoraka te ukoncentriravanje jednog ili više analita (2). Jedan od razloga njene vodeće uloge u bioanalitici je, što za razliku od drugih tehnika pripreme uzoraka, ekstrakcija čvrstom fazom uspješno može ukloniti sve one sastavnice biološkog uzorka koji uzrokuju smanjenje ili povećanje odaziva analita na MS detektoru, tzv. *ion-suppression* i *ion-enhancement*. Premda je objavljeno nekoliko preglednih radova vezano uz pripremu uzoraka u bioanalitici u njima nisu opisani novi sorbensi kao i izvedbene modifikacije tehnike ekstrakcije čvrstom fazom (1, 3, 4).

### Osnovna načela ekstrakcije čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom zasniva se na propuštanju velike količine složenog uzorka kroz reaktivni sorbens odnosno čvrstu fazu smještenu u ulošcima, kolonama ili diskovima različitih veličina u svrhu uklanjanja interferencija prisutnih u uzorku i/ili ukoncentriravanja samog analita ili skupine strukturno sličnih analita.

Analit se razdvaja od ostalih sastavnica uzorka putem tri osnovna mehanizma: selektivna ekstrakcija, selektivno ispiranje i selektivna elucija (slika 1.).

Bez obzira na mehanizam ekstrakcije čvrstom fazom svaki postupak se zasniva na temelju interakcije sustava koji se sastoji od analita, reaktivnog

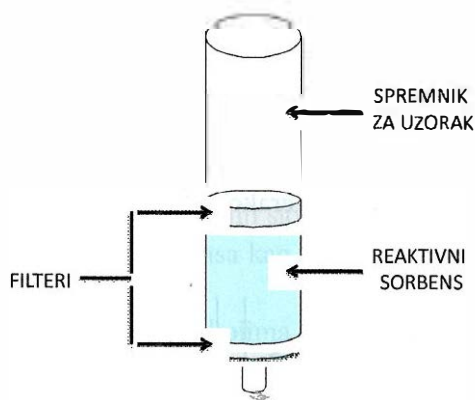


**Slika 1.** ► Shematski prikaz tri osnovna mehanizma ekstrakcije čvrstom fazom: selektivna ekstrakcija (1), selektivno ispiranje (2) i selektivna elucija (3).

sorbensa i otapala. Stoga izbor čvrste faze i otapala ovisi o analitu, uzorku u kojem se on nalazi te analitičkoj tehnici koja će biti primijenjena nakon postupka ekstrakcije.

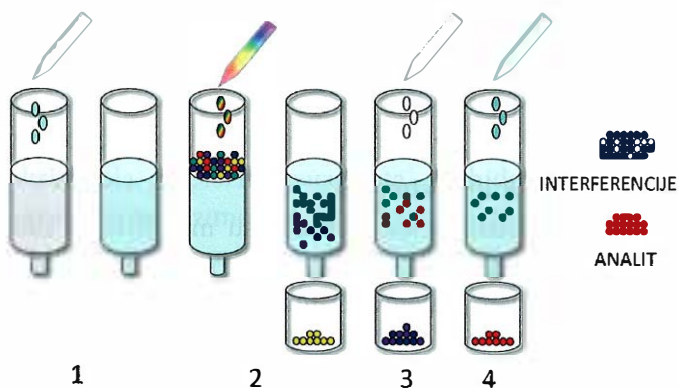
Premda postoji čitav niz izvedbi tehnike reaktivni sorbens se najčešće stavlja u uložak, odnosno staklenu ili plastičnu otvorenu kolonu, između dva filtera napravljena od polietilena, nehrđajućeg čelika ili teflona (slika 2.). U uloške je uobičajeno smješteno od 35 mg do 2 g reaktivnog sorbensa.

Najčešće se postupak ekstrakcije čvrstom fazom provodi u četiri koraka. Prvo se reaktivni sorbens solvativira kako bi se pripremio za nanošenje uzorka. Nakon toga se analit veže za čvrstu fazu nakon čega se ispiru interferencije. Na kraju postupka se eluira i sakuplja sam analit (slika 3.).



Slika 2. ► Shematski prikaz patrona za ekstrakciju čvrstom fazom.

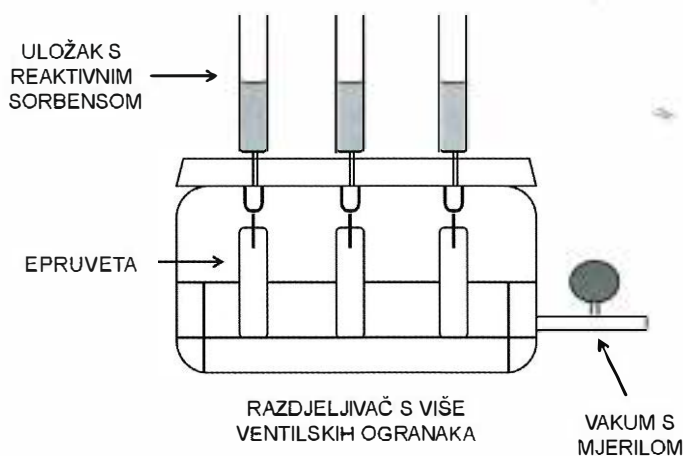
Slika 3. ► Shematski prikaz postupka ekstrakcije čvrstom fazom: solvatacija sorbensa (1), nanošenje uzorka (2), ispiranje interferencija (3) i elucija analita (4)



Razvoj metode obuhvaća pažljivu optimizaciju svih koraka. Priprema reaktivnog sorbensa najčešće se provodi organskim otapalima pri čemu se uklanjaju potencijalne interferencije, koje se mogu naći na sorbensu, te se radi i solvatacija reaktivnog sorbensa. Ovaj korak nije nužan za sve vrste reaktivnih sorbensa. Ukoliko postupak obuhvaća zadržavanje analita na sorbensu uzorak mora biti

pripremljen u otapalu koje omogućava zadržavanje analita. Količina nanesenog uzorka te koncentracija analita u uzorku moraju odgovarati količini sorbensa. Konačno, otapalo kojim se analit eluira sa sorbensa mora biti dovoljno jako da se sav analit oslobodi.

Postupak se najčešće provodi primjenom staklenog, kemijski otpornog razdjelivača s više ventilskih ogranaka (do 24) prikazanog na slici 4. Pri tome je potrebno paziti da brzina kojom otapala prolaze kroz reaktivni sorbens ne smije biti prevelika (do 10 mL/min) kako bi se omogućilo dovoljno vremena analitu i sorbentu za interakciju (5).



**Slika 4.** ◀ Shematski prikaz razdjelivača s više ventilskih ogranaka koji se koristi u ekstrakciji čvrstom fazom.

### Vrste reaktivnih sorbensa

Najčešće korištene vrste sorbensa su modificirani silikagel, polimeri te novi selektivni i inovativni sorbensi poput polimera s molekulskim otiskom, nanomaterijala, materijala ograničenog pristupa i imunoafinitetnih nosača.

### Modificirani silikagel

Među prvim sorbensima koji su se koristili u ekstrakciji čvrstom fazom bio je modificirani silikagel dobiven vezivanjem različitih funkcionalnih skupina za slobodne silanolne skupine prisutne na površini čestica silikagela.

Ekstrakcija čvrstom fazom obrnutih faza se odnosi na bilo koji sustav kod kojeg je reaktivni sorbens manje polaran od analita te se primjenjuje za odjeljivanje slabo polarnih ili nepolarnih analita iz polarnog uzorka. Analit se vezuje za čvrstu fazu van der Waalsovima silama. Reaktivni sorbens dobiva se reakcijom

silanolnih skupina na površini čestice silikagela i organosilana koji sadrži hidrofobne alkilne ili arilne funkcionalne skupine (C1, C2, C4, C8, C18, fenil...). Dva su najčešća načina vezivanja ovih skupina: monofunkcionalni i trifunkcionalni način. Kod monofunkcionalnog načina vezivanja organosilan sadrži jedan atom klora dok kod trifunkcionalnog tri atoma. Trifunkcionalnim vezivanjem organosilana postiže se veća stabilnost sorbensa u ekstremnim pH uvjetima. Jedan od nedostataka ovih sorbensa je zaostajanje slobodnih silanolnih skupina na površini nakon reakcije s organosilanom što ih čini neprikladnim za ekstrakciju polarnih posebice bazičnih spojeva. Za prekrivanje zaostalih slobodnih silanolnih skupina, u novije vrijeme se u pripremi ovih sorbensa kao reagens koristi klortrimetilsilan (5, 6).

U tablici 1. obuhvaćene su bioanalitičke metode u kojima je za pripremu uzoraka korištena ekstrakcija čvrstom fazom te vrsta sorbensa modificirani silikagel. Iz tablice je vidljivo da su primjenjeni sorbensi sa slobodnim i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama te su ekstrakcijske učinkovitosti metoda, prikazane kao prinosi, bile veće od 60 %.

Ekstrakcija čvrstom fazom normalnih faza se primjenjuje za odjeljivanje polarnih analita iz nepolarnih uzoraka. Sorbens čini silikagel modificiran hidrofiličnim, polarnim skupinama poput cijano, amino i diolne. Zadržavanje analita na sorbensu posljedica je interakcije polarnih funkcionalnih skupina analita i nosača (vodikove veze, dipol-dipol veze, dipol-inducirani dipol itd.).

Pregledom literature utvrđeno je kako se ekstrakcija čvrstom fazom normalnih faza posljednjih godina značajno manje koristila u bioanalitičkim metodama. Primijenjena je za određivanje 4 $\beta$ -hidroksikolesterola, oksidacijskog produkta kolesterola ili oksisterola, u plazmi pacijenata. 4 $\beta$ -hidroksikolesterol nastaje metabolizmom kolesterola enzimom CYP 3A4/5 čija se koncentracija značajno povećava kod pacijenata koji uzimaju lijekove induktore spomenutog enzima. Stoga bi mogao predstavljati endogeni marker aktivnosti enzima CYP 3A4/5 te se koristiti u terapijskom praćenju lijekova koji se metaboliziraju ovim enzimom. S obzirom na to da se polarni analit nalazi u nepolarnom otapalu nakon ekstrakcije tekuće-tekuće, primijenjena je i ekstrakcija na polarnom Iso-lute diol sorbensu (Sopachem, Eke, Belgija). Ovaj dodatni korak u pripremi bioloških uzoraka omogućio je razvoj selektivne, osjetljive (LOQ<sup>4</sup> = 10 nM) i robusne LLE-SPE-LC/MS/MS metode za određivanje biomarkera 4 $\beta$ -hidroksikolesterola (19).

---

<sup>4</sup> LOQ - granica određivanja, (engl. *Limit of Quantitation*)

**Tablica 1.** ► Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena ekstrakcija čvrstom fazom obrnutih faza (modificirani silikagel) tijekom pripreme uzorka

| Analit (terapijska skupina lijeka)          | Uzorak              | Sorbens  | Karakteristike sorbensa  | Ekstrakcijska učinkovitost* | Literaturni navod |
|---|---------------------|--|--|-----------------------------|-------------------|
| acebutolol (beta-blokator)                  | plazma              | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 90 %                      | 7                 |
| albendazol (anthelmintik)                   | plazma              | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 71 %                        | 8                 |
| amisulprid (antipsihotik)                   | puna krv            | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 93 %                        | 9                 |
| biomarkeri karcinoma pluća                  | krv, tumorsko tkivo | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | nije navedeno               | 10                |
| budezonid (kortikosteroid)                  | bronhalni sekret    | Isolute, MFC18 (International Sorbent Technology LTD, Hengoed, UK)       | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i slobodnim silanolnim skupinama             | 99 %                        | 11                |
| buprenorfin                                 | puna krv            | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 90 %                      | 12                |
| celiprolol (beta-blokator treće generacije) | plazma              | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 90 %                      | 7                 |
| dietilkarbamazin (anthelmintik)             | plazma              | Bond Elute <sup>●</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 66 %                        | 8                 |

| Analit (terapijska skupina lijeka)                                | Uzorak                   | Sorbens  | Karakteristike sorbensa  | Ekstrakcijska učinkovitost <sup>c</sup> | Literaturni navod |
|---|--------------------------|--|--|---|-------------------|
| domperidon (selektivni antagonisti dopaminskih D2 i D3 receptora) | plazma                   | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 85–100 %                                | 13                |
| flutikazon (kortikosteroid)                                       | bronhalni sekret         | Isolute, MFC18 (International Sorbent Technology LTD, Hengoed, UK)       | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i slobodnim silanolnim skupinama             | 84 %                                    | 11                |
| lakozamid (antikonvulziv)   | plazma                   | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | nije navedeno                           | 14                |
| lamotrigin (antikonvulziv)  | puna krv                 | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | nije navedeno                           | 15                |
| levetiracetam (antikonvulziv)                                     | puna krv                 | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | nije navedeno                           | 15                |
| levetiracetam-d6 (antikonvulziv) <sup>22</sup>                    | plazma                   | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | nije navedeno                           | 14                |
| R- i S-metadon (lijek za lječenje ovisnosti)                      | puna krv                 | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 90 %                                  | 12                |
| mitotani i metaboliti (citostatik)                                | plazma, eritrociti, urin | Discovery DSC-18 (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)                          | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 81 %                                  | 16                |



| Analit (terapijska skupina lijeka)   | Uzorak   | Sorbens  | Karakteristike sorbensa  | Ekstrakcijska učinkovitost*               | Literaturni navod |
|--|----------|--|--|---|-------------------|
| morfin i metabolit morfin-6-glukuronid (opioidni analgetik)                                  | puna krv | Bond Elute <sup>•</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | > 90 % morfin<br>30 % morfin-6-glukuronid | 12                |
| oksibendazol (anthelmintik) <sup>•,†</sup>   | plazma   | Bond Elute <sup>®</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 100 %                                     | 8                 |
| protriptilin (triciklički antidepresiv) <sup>•,†</sup>                                       | puna krv | Bond Elute <sup>•</sup> C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18) i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama | 94 %                                      | 9                 |
| tiaprid i metabolit N-desetil tiaprida (selektivni antagonist dopaminskih D2 i D3 receptora) | plazma   | DSC-PH (Supelco, Bellefonte, PA, SAD)                                    | modificirani silikagel koji sadrži fenilnu funkcionalnu skupinu  | 82–94 %                                   | 17                |
| 1-(2'-deoksi-2'-fluoro-β-D-arabino-furanosil) uracila (FAU) i metabolit (antitumorski lijek) | plazma   | Sep Pac C18 (Waters Corporation, Milford, MA, SAD)                       | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C18)  | 60–79 %                                   | 18                |

\* ekstrakcijska učinkovitost je iskazana kao prinos (%)

\*\* u bioanalitičkoj metodi korišten kao unutarnji standard

### Polimerni sorbensi

U novije vrijeme se kao sorbensi u ekstrakciji čvrstom fazom koriste i porozni polimeri. Uz to što ne sadrže zaostale slobodne silanolne skupine, kao prednost je potrebno istaknuti i stabilnost polimera u pH području od 1 do 14 te kapacitet za veće volumene uzorka. Među najčešće korištenim polimerima u bioanalitičkim metodama je hidrofobna smola stiren-divinilbenzen kopolimer (PS-DVB)<sup>5</sup> čija je površina pokrivena relativno velikim brojem aktivnih aromatskih mjesta koja stupaju u  $\pi$ - $\pi$  interakcije s dvostrukim i trostrukim vezama prisutnim u strukturama analita. U ovu skupinu se ubrajaju i hidrofilni-lipofilni kopolimeri koji se sastoje od *N*-vinilpirolidona te divinilbenzena. Hidrofilni *N*-vinilpirolidon omogućava zadržavanje vlažnosti polimera te ekstrakciju polarnih analita dok lipofilni divinilbenzen omogućava zadržavanje nepolarnih analita. Osim što je prikladan za polarne i nepolarne analite, ovaj sorbens zadržava ekstrakciji učinkovitost čak i ako se isuši što ga čini prikladnim za automatiziranu pripremu uzoraka (5, 6).

Bond Elute Plexa (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) je nepolarni polimerni PS-DVB sorbens kod kojeg je polimerizacija provedena tako da se dobiju iznimno sitne, ujednačene čestice. Sorbens čini hidrofobna jezgra okružena hidrofilnom površinom. Namijenjen je biološkim uzorcima jer je vezanje proteina i lipida za površinu čestica zanemarivo. Također je potrebno istaknuti kako je Bond Elute Plexa sorbensom moguće ekstrahirati kisele, bazične te neutralne analite. Upravo zbog njegove namjene za raznovrsne analite Fernandez-Torres i suradnici (20) upotrebili su ovaj sorbens za istovremenu ekstrakciju čak 23 analita (11 antibiotika i njihove metabolite) iz urina pacijenata.

Gabler i suradnici (21) ekstrahirali su biomarkere feokromocitoma metanefrin i normetanefrin iz urina pacijenata. Kako bi analite uspješno ekstrahirali Bond Elute Plexa sorbensom, proveli su kompleksaciju metanefrina i normetanefrina difenilboronskom kiselinom. Potom su predložili i modificiranu metodu koja uključuje i hidrolizu uzoraka prije samog postupka ekstrakcije (22).

Univerzalni obrnuto fazni polimer Oasis HLB (Waters Corporation, Milford, SAD) pokazao se također prikladnim za raznovrsne analite. Parekh i suradnici (23) ispitali su tri različite tehnike pripreme uzoraka u svrhu razvoja metode za određivanje bosentana, kompetitivnog antagonista endotelina za endotelin-A i endotelin-B receptore koji se primjenjuje u liječenju pulmonarne arterijske

<sup>5</sup> PS-DVB - stiren-divinilbenzen kopolimer (engl. *Polystyrene Divinylbenzene*)

hipertenzije. Direktnim taloženjem proteina ne samo da je dobivena niska ekstrakcijska učinkovitost ( $\leq 24\%$ ) nego su zaostali fosfolipidi uzrokovali smanjenje odaziva MS detektora. S druge strane ekstrakcijom tekuće-tekuće dobivena je nešto bolja ekstrakcijska učinkovitost ( $\leq 60\%$ ), ali i slaba ponovljivost postupka ekstrakcije. Konačno primjenom navedenog sorbensa dobivena je izvanredna ekstrakcijska učinkovitost od preko  $92\%$ , kao i ponovljivost ( $99\text{--}104\%$ ).

Različite tehnike pripreme uzoraka ispitali su i Page-Sharp i suradnici (24) za određivanje primakina i metabolita karboksiprimakina u plazmi djece oboljele od malarije. Direktnim taloženjem proteina nije postignuta ni zadovoljavajuća ekstrakcijska učinkovitost ( $\leq 60\%$ ) niti osjetljivost metode budući da su dodana organska otapala značajno razrijedila uzorke. Različitim protokolima za ekstrakciju tekuće-tekuće postignuta je nešto bolja ekstrakcijska učinkovitost primakina ( $\geq 75\%$ ), ali nedovoljno dobra karboksiprimakina ( $\leq 65\%$ ). Stoga je u ispitivanje uključena ekstrakcija čvrstom fazom. Polimerom Oasis<sup>®</sup> HLB postignuta je ekstrakcijska učinkovitost veća od  $85\%$  za oba analita i unutarnji standard 8-aminokinolin.

Primjena ekstrakcije čvrstom fazom kao tehnike pripreme bioloških uzoraka iznimno je opravdana s obzirom na nestabilnost i visoku cijenu kiralnih kromatografskih kolona. Trantinterol je snažni selektivni agonist  $\beta_2$ -adrenoreceptora s produženim djelovanjem i manje izraženim neželjenim popratnim pojavama u odnosu na druge lijekove iste terapijske skupine. Kiralan je spoj te su stereoselektivne farmakološke studije pokazale kako (-)-trantinterol ima jači terapijski učinak nego ( $\pm$ )-trantinterol i (+)-trantinterol. Kako bi odredili koncentraciju pojedinog enantiomera u plazmi pacijenata Qin i suradnici (25) ispitali su ekstrakcijsku učinkovitost primjenom tri različita sorbensa. Trantinterol je lipofilan spoj te su ispitana dva sorbensa kod kojih su na silanolne skupine vezani hidrofobni alkanski lanci s 18 ugljikovih atoma: Strata C18-E (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) i Cleanert C18 (Agela Technologies, Wilmington, DE, SAD). Također je u ispitivanje uzet i polimer Oasis<sup>®</sup> HLB. Sva tri sorbensa uspješno su uklonila interferencije iz biološkog uzorka, no veća ekstrakcijska učinkovitost, kao i bolja ponovljivost ekstrakcijskog postupka, dobivena je primjenom polimernog sorbensa. Dobivene rezultate moguće je vrlo jednostavno objasniti budući da fenilna skupina polimera omogućava selektivniju interakciju preko  $\pi$ - $\pi$  interakcija sorbensa s analitima koji poput trantinterol također sadrže ovu skupinu. Premda se trantinterol već neko vrijeme koristi u terapiji pacijenata oboljelih od astme, još uvijek je mali broj studija proveden kojima bi se ispitao njegov metabolički put. Zato su Quin i suradnici (26) razvili i metodu za određivanje ne samo trantinterola već i njegovih metabolita u urinu

pacijenata. Bioanalitička metoda ponovo je uključivala ekstrakciju analita Oasis<sup>®</sup> HLB polimernom sorbensom te potom identifikaciju i kvantifikaciju UHPLC/MS/MS tehnikom. Potom su bioanalitičku metodu prilagodili za određivanje trantinterola i metabolita u plazmi (27).

Isti sorbens korišten je i za ekstrakciju simeprevira, inhibitora NS3/4A proteaze koji se propisuje u liječenju kroničnog hepatitisa C (28), lokalnih anestetika (prokaina, mepivakaina, lidokaina, ropivakaina, oksibuprokaina, tetrakaina, bupivakaina i dibukaina) (29), antagonista benzodiazepinskih receptora flumazenila (30), potencijalnog antitumorskog lijeka pilaralisiba (31) te antihipertenziva amlodipina, valsartana i hidroklorotiazida (32).

Nadalje, López-Guarnido i suradnici (33) koristili su isti sorbens za ekstrakciju kokaina iz kose ovisnika. U ispitivanje je uključen i benzoilekgonin, metabolit kokaina koji se prvenstveno nakuplja u kosi te etilbenzoilekgonin, metabolit koji nastaje tijekom istovremenog uzimanja kokaina i alkohola. Kako bi se uklonile kontaminacije prisutne na površini kose, uzorci su prije nanošenja na sorbens isprani otopinom Tween 80, osušeni i usitnjeni (1 mm). 10 mM boratni pufer (pH = 9) dodan je neposredno prije uzorka kako bi se olakšalo zadržavanje analita na sorbensu, dok je octena kiselina omogućila protonaciju tercijarne amino skupine te na taj način pospješila eluciju analita sa sorbensa.

Polimerni sorbens koji na površini sadrži vezan *N*-vinilpirolidon, Strata<sup>™</sup>-X (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) ulazi u interakciju s analitima preko hidrofobnih interakcija,  $\pi$ - $\pi$  veza te vodikovih veza odnosno dipol-dipol interakcija. Stoga je upravo ovaj sorbens primijenjen za ekstrakciju selektivnog agonista 5-hidroksitriptamin<sub>1B/1D</sub> receptora, zolmitriptana, kao i njegova aktivnijeg metabolita *N*-desmetil zolmitriptana iz plazme pacijenata. Dobivena je visoka ekstrakcijska učinkovitost veća od 92 %. S obzirom na to da su endogeni fosfolipidi, prisutni u biološkim uzorcima, glavni razlog smanjenog ili uvećanog odaziva na MS detektoru, ispitana je i učinkovitost polimernog sorbensa za uklanjanje 6 reprezentativnih fosfolipida. Ispitivanjem je utvrđeno kako dodatak 2 mM amonijevog acetata (pH = 3) u fazu ispiranja sorbensa značajno smanjuje udio ovih interferencija u samom eluatu. Premda glicerofosfokolin nije u potpunosti uklonjen iz eluata, njegova koncentracija je dovoljno mala da nema utjecaj na odaziv analita na MS detektoru kao ni na rad instrumenta (34).

Istim sorbensom učinkovito su uklonjene interferencije i kod razvoja metode za određivanje aripiprazola, antipsihotika koji se primjenjuje u terapiji shizofrenije i bipolarnog poremećaja, u plazmi pacijenata. Nakon optimiziranog postupka ekstrakcije utjecaj interferencija na odaziv MS detektora bio je otprilike 1 % (35).

Primjenom polimernog sorbensa Strata™-X, namijenjenog ekstrakciji analita različite polarnosti, Patel i suradnici (36) postigli su izvanrednu ekstrakcijsku učinkovitost za sumatriptan i naproksen (95–98 %) iz plazme ispitanika nakon primjene različitih doza (sumatriptan 85 mg, naproksen 500 mg). Ispiranjem sorbensa s amonijevim acetatom te metanolom uklonili su interferencije iz plazme te je kromatografska analiza trajala svega 1,6 minuta. Zadovoljavajuća osjetljivost metode (LLOQ = 50 pg/mL) omogućila je primjenu novorazvijene SPE-LC/MS/MS metode u studiji bioekvivalencije.

Ovaj sorbens primijenjen je i za ekstrakciju kombretastatina A1, aktivnog metabolita kombretastatina A1 bifosfonata (37), nitrofurantoina (38), nifedipina, dihidropiridinskog antagonista kalcijevih kanala s antianginalnim i antihipertenzivnim djelovanjem (39), tuberkulostatika etionamida i njegova metabolita etionamid sulfoksida (40) te lijekova koji se koriste u terapiji diabetesa tip II linagliptina i metformina (41) kao i kanagliflozina (42) iz plazme pacijenata.

Sorbens Strata™-X-Drug N (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) polimerni je sorbens namijenjen ekstrakciji neutralnih analita iz bioloških uzoraka. Nakon i suradnici (43) primijenili su ga za ekstrakciju diuretika indapamida iz uzoraka pune krvi pacijenata. Tijekom optimizacije postupka ekstrakcije ispitan je utjecaj pH fosfatnog pufera na ekstrakcijsku učinkovitost te je utvrđeno kako se pri pH 6,8 dobiva izvanredna ekstrakcijska učinkovitost (91–94 %).

LiChrosep Sequence (Merck, Mumbai, Indija) polidivinilbenzenski polimerni sorbens također je korišten u razvoju bioanalitičkih metoda. Yadav i suradnici (44) predložili su novu SPE-LC/MS/MS metodu za određivanje peptidnog lijeka atazanavira u uzorcima plazme pacijenata oboljelih od AIDS-a. Ispitane su različite tehnike pripreme uzoraka, ali je samo primjenom navedenog sorbensa dobivena i zadovoljavajuća ekstrakcijska učinkovitost (84–87 %) i uklanjanje interferencija (utjecaj interferencija bio je oko 5 %).

Takrolimus je makrolidni laktonski imunosupresiv koji se primjenjuje u terapiji pacijenata nakon transplantacije organa. Kako bi se pacijentima omogućilo prikladno liječenje potrebno je redovito provjeravati koncentraciju lijeka u krvi budući da mnogi parametri utječu na farmakokinetiku lijeka poput interindividualnih razlika, tijeka bolesti, drugih lijekova i prehrane. Bioanalitička metoda za njegovo određivanje mora biti prvenstveno osjetljiva i točna budući da lijek ima iznimno usko terapijsko područje te se u plazmi nalazi u niskim koncentracijama između 5 i 15 ng/mL. Stoga su Upadhyay i suradnici (45) predložili novu SPE-UHPLC/MS/MS metodu za određivanje takrolimusa u plazmi. Ponovo primjenom LiChrosep Sequence sorbensa postignuta je izvanredna ekstrakcijska učinkovitost metode ( $\geq 96$  %) kao i osjetljivost (LOQ = 0,2 ng/mL) te je metoda primjenjena u studiji bioekvivalencije.

SampliQ OPT (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) je poliamidni polimerni sorbens namijenjen ekstrakciji neutralnih, ali i slabo kiselih kao i slabo bazičnih analita. Stabilan je u širokom pH području, a analite zadržava na temelju hidrofilnih i lipofilnih interakcija. Tonic-Ribarska i suradnici (46) razvili su novu SPE-HPLC/DAD metodu za određivanje koncentracije valproične kiseline u slini pacijenata oboljelih od epilepsije primjenom upravo ovog sorbensa. Slina sadrži velik broj organskih i anorganskih tvari poput vode, elektrolita, enzima i hormona te pored sastojaka endogenog porijekla može sadržavati i one egzogenog poput lijekova i sastavnica hrane. S analitičkog stajališta složen je uzorak budući da je viskozna i ljepljiva. Ipak, jednostavno i neinvazivno prikupljanje ovog biološkog materijala daju slini prednost pred plazmom i serumom. Određivanje koncentracije lijeka iz sline posebice je prikladno kako za djecu i starce tako i za psihijatrijske pacijente. Tijekom optimizacije uvjeta ekstrakcije čvrstom fazom istraživačka grupa je ispitala dvije vrste sorbensa: SampliQ C18 i SampliQ OPT. SampliQ C18 sorbens modificirani je silikagel s neprekrivenim slobodnim silanolnim skupinama namijenjen ekstrakciji polarnih i nepolarnih analita. S obzirom da valproična kiselina u strukturi sadrži kiselu karboksilnu skupinu, a slobodne silanolne skupine prisutne na površini reaktivnog sorbensa omogućavaju zadržavanje prvenstveno bazičnih analita, nije iznenađujuće da je značajno bolja ekstrakcijska učinkovitost od 99 % dobivena primjenom upravo polimernog sorbensa.

### **Sorbensi s višestrukim mehanizmom**

U svrhu postizanja bolje selektivnosti ekstrakcijskog postupka u novije vrijeme se tijekom razvoja bioanalitičkih metoda sve više koriste reaktivni sorbensi kod kojih se interakcije funkcionalnih skupina čvrste faze i analita odvijaju preko dva ili više mehanizama. Najčešće se ujedanjuju svojstva ekstrakcije obrnutih faza modificiranog silikagela ili polimera i ionsko izmjenjivačke ekstrakcije. Ionsko izmjenjivačka ekstrakcija čvrstom fazom primjenjuje se za odjeljivanje ioniziranih, anionskih ili kationskih, analita iz vodenih, rjeđe organskih uzoraka. Mehanizam zadržavanja analita na čvrstoj fazi se zasniva na elektrostatskom privlačenju ioniziranih funkcionalnih skupina analita i površine reaktivnog sorbensa. Kao sorbens koriste se silikagel ili polimer kemijski modificirani tako da na površini sadrže različite ionizirajuće funkcionalne skupine. Ovisno o funkcionalnim skupinama vezanim za površinu sorbensa razlikuju se kationsko izmjenjivačka i anionsko izmjenjivačka ekstrakcija na čvrstim fazama. Kako bi se postigla optimalna ekstrakcija, pH uvjeti se moraju prethodno podesiti tako da funkcionalne skupine i analita i čvrste faze budu ionizirane. Eluiranje analita

moguće je provesti promjenom pH, odnosno neutralizacijom funkcionalnih skupina analita ili sorbensa. Nadalje, analit je moguće eluirati primjenom eluenta velike ionske jakosti ili pufera koji sadrži ione s većim afinitetom za funkcionalne skupine sorbensa od analita.

Bond Elut Certify sorbens (Agilent Technologies, Santa Clara, SAD) je modificirani silikagel koji ima na površini vezane nepolarne alkanske lance od 8 ugljikovih atoma te benzensulfonsku kiselinu koja ima ulogu jakog kationskog izmjenjivača. Namijenjen je ekstrakciji analita koji imaju i nepolarne i kationske skupine. Dalsgaard i suradnici (47) ekstrahirali su primjenom ovog sorbensa 175 bazičnih spojeva iz skupine kardiovaskularnih lijekova, psihoaktivnih tvari i opijata iz svega 200  $\mu$ L pune krvi.

Pretraživanjem literature utvrđeno je kako su značajno češće, ipak, korišteni polimerni sorbensi kojima su na površini vezane ionsko-izmjenjivačke skupine. Za ekstrakciju antivirusnog lijeka cidofovira, polarne molekule koja u strukturi sadrži tri ionizirajuće funkcionalne skupine ( $pK_a$  vrijednosti 2,15, 4,57 i 7,00) te je ovisno o pH medija prisutna kao pozitivno ili negativno nabijena molekula odnosno kao zwitter-ion, Lecomte i suradnici (48) ispitali su ekstrakcijsku učinkovitost niza sorbensa kationskih i anionskih izmjenjivača. Najučinkovitija ekstrakcija, veća od 80 %, dobivena je polimernim kation izmjenjivačkim sorbensom Bond Elut Plexa PCX (Agilent Technology, Santa Clara, CA, SAD).

Polimerni kation izmjenjivački sorbens Oasis MCX kolona primijenjen je za istovremeno određivanje bazičnih spojeva nikotina i polarnih metabolita, kotinina i *trans*-3'-hidroksikotinina u uzorcima sline. Predložena metoda pokazala se prikladnom za rutinsku primjenu s obzirom na to da je uzimanje uzoraka neinvazivno te nije potrebno educirano medicinsko osoblje. Nadalje, niska osjetljivost metode (LLOQ = 0,5 ng/mL) omogućava njenu primjenu ne samo kod ovisnika o nikotinu već i za praćenje izloženosti stanovništva pasivnom pušenju (49).

Polimerni sorbens, koji objedinjuje ekstrakcijski mehanizam obrnutih faza i slabih kationskih izmjenjivača, Oasis WCX (Waters Corporation, Milford, SAD) na površini sadrži karboksilnu skupinu koja omogućava ekstrakciju bazičnih, kationskih spojeva. Primijenjen je za ekstrakciju (ekstrakcijska učinkovitost je bila oko 77 %) terapijskog peptida dezmozpresina koji pokazuje antidiuretička svojstva iz plazme (50).

Citostatik imatinib, inhibitor tirozin-kinaze, u strukturi sadrži 7 amino skupina te je za njegovu ekstrakciju iz plazme i koštane srži upotrebljen Strata-X-C<sup>TM</sup> sorbens (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) koji objedinjuje ekstrakcijske mehanizme obrnute faze i jakog kationskog izmjenjivača. Ovaj polimerni sorbens s vezanim sulfonskim skupinama selektivno vezuje bazične spojeve kojima

je  $pK_a$  vrijednost manja od 10,5. Dobivena ekstrakcijska učinkovitost za imatinib bila je 89 %. Štoviše, koncentracija lijeka nađena u plazmi i koštanoj srži pacijenata korelira sa stupnjem citogenetskog odgovora na terapiju (51).

Strata-X-CW<sup>TM</sup> (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) sorbens objedinjuje ekstrakcijske mehanizme obrnute faze i slabog kationskog izmjenjivača te na polimeru ima vezane karboksilne skupine koje selektivno vezuju slabo bazične spojeve. Stoga je upravo ovaj sorbens primjenjen za istovremenu ekstrakciju tri slabo bazična toksina  $\alpha$ -amanitina,  $\beta$ -amanitina te muskarina iz urina pacijenata otrovanih gljivama (52).

Zanimljivo je da je pretraživanjem literature nađena samo jedna bioanalitička metoda kod koje se koristi sorbens koji objedinjuje ekstrakcijske mehanizme obrnute faze i anionskog izmjenjivača. Wang i suradnici (53) su nakon enzimatske hidrolize ekstrahirali 10 endogenih steroidnih hormona, 14 metabolita ftalata te bisfenol A primjenom sorbensa Oasis<sup>®</sup> MAX. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava analita bilo ih je moguće eluirati sa sorbensa u dvije odvojene frakcije; steroidni hormoni i bisfenol A eluirani kao prva frakcija metanolom, za eluciju metabolita ftalata korištena je 1 %-tna otopina mravlje kiseline u metanolu.

### Selektivni sorbensi

Jedan od trenutno vodećih trendova u ekstrakciji čvrstom fazom je razvoj novih selektivnih sorbensa koji uz selektivnost za određeni analit ili skupinu analita pokušavaju ispuniti i druge zahtjeve poput veće površine, jednostavnog razvoja metode i niske cijene proizvodnje (3).

### Polimeri s molekulskim otiskom

Polimer s molekulskim otiskom (MIP)<sup>6</sup> je sintetički polimer za kojeg se tijekom polimerizacije molekula predložak vezuje kovalentnim i nekovalentnim vezama koja se potom uklanja kemijskom reakcijom ili ekstrakcijom. Dakle, na polimeru zaostanu slobodna mjesta vezanja koja su komplementarna analitu s obzirom na veličinu, oblik te položaj funkcionalnih skupina. Prije korištenja sorbensa potrebno je ispitati utjecaj temperature, pH i organskih otapala na njegovu stabilnost, ispitati njegov kapacitet i selektivnost te ga okarakterizirati primjenom IR spektroskopije i skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Izvanredna selektivnost, primjenjivost za iznimno složene uzorke, stabilnost na temperaturama čak do 120 °C, kao i u širokom pH području, inertnost prema čitavom

<sup>6</sup> MIP - polimer s molekulskim otiskom, (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*)



nizu organskih otapala samo su neke od prednosti ovih sorbensa zbog čega je njihova primjena u bioanalitici posljednjih godina sve učestalija (54). Pored laboratorijski pripremljenih sorbensa posljednjih godina na tržištu se mogu naći i komercijalno dostupni polimeri namijenjeni za specifične bioanalitičke metode.

Pretraživanjem znanstvene literature moguće je naći bioanalitičke metode koje koriste polimere s molekulskim otiskom sintetizirane za ekstrakciju opioidnog analgetika tramadola iz seruma i urina (55), biomarkera izloženosti polici-kličkim aromatskim ugljikovodicima 1-hidroksipirena iz urina (56), kotinina (metabolita nikotinina) iz sline (57), koenzima Q10 iz urina (58) te atenolola iz seruma (59). Polimer iznimno sitnih čestica za ekstrakciju acetilsalicine kiseline i njenih metabolita iz urina pacijenata primjenom *sol-gel* polimerizacije sintetizirali su Bhatia i suradnici (60).

Boonjob i suradnici (61) ispitali su ekstrakciju  $\beta$ -blokatora iz urina pacijenta primjenom različitih komercijalno dostupnih sorbensa: polimernih (Oasis<sup>®</sup> HLB i Bond Elute Plexa), sorbensa koji objedinjuju ekstrakcijske mehanizme obrnute faze i kationskog izmjenjivača (Oasis<sup>®</sup> MCX i Bond Elute Plexa PCX), sorbensa koji objedinjuju ekstrakcijske mehanizme obrnute faze i anionskog izmjenjivača (Oasis<sup>®</sup> MAX i Bond Elute Plexa PAX) i komercijalno dostupnog polimera s molekulskim otiskom (SupelMIP –  $\beta$ -blokator, Supelco, Bellefonte, PA, SAD). Ekstrakcijski postupak na polimernim sorbensima proveden je pri pH 7 te su bazične amino skupine ( $pK_a$  9) bile pozitivno nabijene. Oba polimerna sorbensa ipak su zadovoljavajuće zadržavala analite. S obzirom na to da svi analiti u strukturi sadrže sekundarne amino skupine koje se lako mogu protonirati i vezati za sorbense Oasis<sup>®</sup> MCX i Bond Elute Plexa PCX, vrlo dobra ekstrakcijska učinkovitost (79–89 %) nije iznenađujuća. S druge strane, analiti ne mogu stvoriti negativno nabijene ione te njihovo zadržavanje na Oasis<sup>®</sup> MAX i Bond Elute Plexa PAX sorbensima je posljedica isključivo nepolarnih interakcija te je i očekivano dobivena niska ekstrakcijska učinkovitost ( $\leq 72$  %). Polimer s molekulskim otiskom, SupelMIP –  $\beta$ -blokator, namijenjen je selektivnom vezanju spojeva iz skupine  $\beta$ -blokatora. Jednostavan protokol ekstrakcije te visoka učinkovitost (82–94 %) omogućava primjenu metode za rutinske analize.

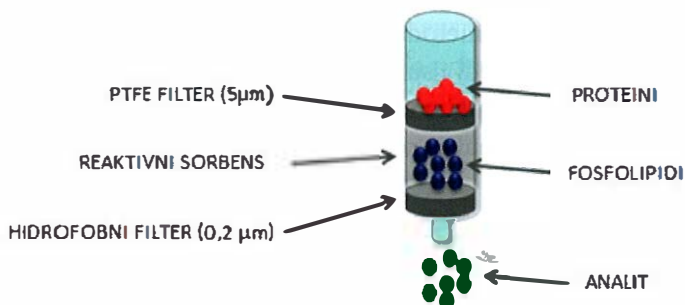
Također komercijalno dostupan polimer s molekulskim otiskom (SupelMIP – amphetamine, Supelco, Bellefonte, PA, SAD) primijenjen je za ekstrakciju amfetamina, metamfetamina i pet psihoaktivnih tvari iz pune krvi (62).

### Sorbensi koji uklanjaju proteine i fosfolipide

Ovi sorbensi selektivno uklanjaju proteine i fosfolipide iz plazme objedinjujući tehnike direktnog taloženja proteina i ekstrakcije čvrstom fazom. Sustav se

sastoji od filtera između kojih je modificirani silikagel na kojem su vezani cirkonijevi ioni (slika 5.). Proteini se uklanjaju dodatkom zakiseljenog acetonitrila te se zadržavaju na prvom filteru. Fosfolipidi se zadržavaju na reaktivnom sorbensu budući da se cirkonijevi ioni zbog praznih d-orbitala ponašaju kao elektron akceptori te vezuju polarne glave fosfolipida, jake elektron donore.

**Slika 5.** ► Prikaz ekstrakcijskog postupka primjenom HybridSPE-PTT tehnologija

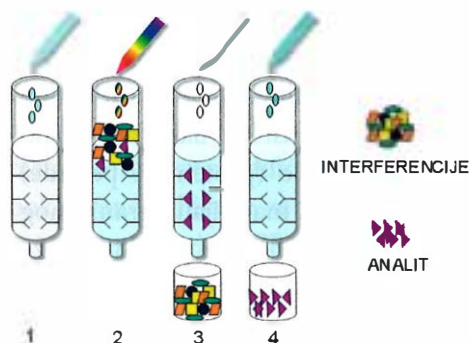


Silvero i suradnici (63) razvili su metodu za određivanje klopidogetra u plazmi pacijenata te su HybridSPE-PTT sorbensom uspješno uklonili interferencije iz uzoraka i smanjili povratnu konverziju metabolita u lijek.

Isti sorbens je korišten i za ekstrakciju antitumorskog lijeka karboplatina iz plazme pacijenata. Ekstrakcija ovog iznimno polarnog analita otežana je uobičajnim sorbensima koji se koriste u ekstrakciji čvrstom fazom. No, primjenom HybridSPE-PTT sorbensa postignuto je izvanredno uklanjanje proteina i fosfolipida iz uzoraka što je omogućilo trajanje kromatografske analize od svega 2,6 minuta (64).

### Imunosorbensi

Imunosorbensi se dobivaju kovalentnim vezanjem bioloških antitijela za čestice silikagela, agaroze i različitih gelova (slika 6.). Iznimno su selektivni ili za jedan analit ili za skupinu analita te omogućavaju ukoncentriranje malih količina analita iz uzoraka velikih volumena. Analit (antigen) se vezuje za čvrstu fazu (antitijelo)



**Slika 6.** ► Ekstrakcija na čvrstoj fazi primjenom imunoafinitetnih gelova: solvatacija sorbensa (1), nanošenje uzorka (2), ispiranje interferencija (3) i elucija analita (4).

različitim interakcijskim mehanizmima poput vodikovih veza, hidrofobnim privlačenjem kao i van der Waalsovih silama. Primjena ovih sorbena za sada je prilično ograničena budući da su kemijski i termalno nestabilni, a i postupak njihove pripreme je zahtjevan i skup (3, 4).

Iz literaturnih podataka moguće je uočiti kako je većina imunosorbena pripremljena u istraživačkim laboratorijima. Svega mali broj imunosorbena je komercijalno dostupan. Stoga nije iznenađujuće da je pretraživanjem literature nađen mali broj metoda koje koriste ovu vrstu sorbena općenito, a posebice u bioanalitici. Schedl i suradnici (65) predložili su metodu za praćenje koncentracije hidrosiliranih policikličkih aromatskih ugljikovodika u urinu ispitanika. Za ekstrakciju analita pripremljen je imunosorbens s anti-pirenom kao antitijelom.

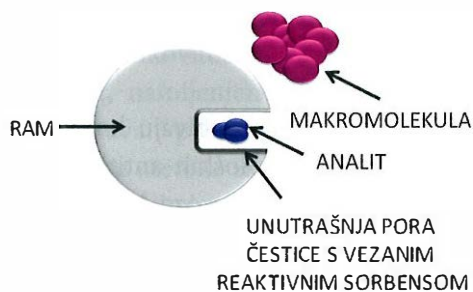
### Oligosorbensi

Na oligosorbense imobilizirani su odabrani aptameri, odnosno oligonukleotidi (DNA ili RNA) koji sadrže specifičan slijed nukleotida sposoban vezati ciljani analit. Iako je njihova primjena u pripremi bioloških uzoraka tek u začetku, potrebno je istaknuti kako su ovako pripremljene čvrste faze značajno stabilnije u odnosu na imunosorbense (3, 4).

Za sada je, osim u analitici hrane i pića, ekstrakcija oligosorbensom primjenjena u određivanju koncentracije kokaina u plazmi *post-mortem* kod smrti uzrokovane predoziranjem ovom psihoaktivnom drogom (66). Provedenim istraživanjem uočeno je značajno bolje pročišćavanje uzoraka primjenom oligosorbensa nego tehnikom taloženja proteina. Postignuta je visoka selektivnost, ali i ekstrakcijska učinkovitost od gotovo 90 %.

### Materijali ograničenog pristupa

U novije vrijeme se sve češće koriste reaktivni sorbensi koji uklanjaju ciljano makromolekule (proteine i peptide) iz uzoraka tzv. materijali ograničenog pristupa (RAM)<sup>7</sup>. Male molekule ulaze u pore sorbena i tamo stupaju u interakciju s funkcionalnim skupinama na površini pora, dok se velike molekule ispiru s eluentom (slika 7.). Ovaj sorbens



Slika 7. ► Shematski prikaz materijala ograničenog pristupa.

<sup>7</sup> RAM - materijali ograničenog pristupa, (engl. *Restricted Access Material*)

objedinjuje mehanizme obrnutih faza i kromatografije isključenjem na osnovi veličine čestica (3–6).

Ye i suradnici (67) pripremili novi inovativni sorbens koji objedinjuje ekstrakcijske mehanizme nanočestica i materijala ograničenog pristupa za ekstrakciju četiri steroidna hormona iz uzoraka urina. Magnetske nanočestice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  funkcionalizirali su prvo s dodeciltrietoksisilanom te su ih potom presvucli s neionskim surfaktantima Tween-20, 40, 60, 85 i Span-40, 60, 80. Na ovaj način analiti male molekulske mase zadržavani su na sorbensu, dok je surfaktant s površine čestica sprječavao zadržavanje makromolekula prisutnih u uzorku.

### Nanomaterijali

Nanostrukturirani materijali su tvari kojima je barem jedna vanjska dimenzija veličine od 1 do 100 nm. Mogu biti u obliku pojedinačnih čestica, fuzioniranih čestica te agregata ili aglomerata sferičnih, tubularnih ili nepravilnih oblika. Imaju jedinstvena fizikalna i kemijska svojstva zbog kojih gotovo 30 godina privlače pažnju znanstvenika iz različitih područja. Stoga nije iznenađujuće da se primjenjuju i u ekstrakciji čvrstom fazom. Ugljikove nanocjevčice pripadaju skupini jedno-dimenzionalnih nanomaterijala. Mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine one s jednom stijenkom ili višestijenčane. Iznimna svojstva ugljikovih nanocjevčica poput velike površine, mogućnosti za stvaranje  $\pi$ - $\pi$  interakcija te izvanredna kemijska, termalna i mehanička stabilnost omogućavaju njihovu primjenu za ekstrakciju nepolarnih i polarnih analita iz vodenog medija. Nanovlakna su dvo-dimenzionalni nanomaterijali koji zbog iznimno velikog omjera površine i volumena mogu vezati na sebe brojne analite. Nanočestice, kao tro-dimenzionalni nanomaterijal, osobito su zanimljive zbog njihove kemijske reaktivnosti, ali i optičkog ponašanja. Kao sorbensi koriste se anorganski oksidi, mezoporozne i magnetske nanočestice te ih je za postizanje bolje selektivnosti moguće dodatno presvući organskim i anorganskim tvarima: silikatom, oktadecilsilanom, surfaktantima itd. (68, 69).

Kao sorbens za ekstrakciju čvrstom fazom koriste se modificirane ugljikove nanocjevčice. Jedan takav primjer su karboksilirane ugljikove nanocjevčice koje se dobivaju oksidacijom u otopini sulfatne i nitratne kiseline. Tako pripremljene nanocjevčice moguće je dodatno imobilizirati na silanizirani nosač kako bi se postigla bolja adsorptivna učinkovitost. Ekstrakcija analita iz složenih uzoraka odvija se na temelju dva mehanizma: ionskih interakcija s karboksilnim grupama i hidrofobnih interakcija s površinom modificiranih ugljikovih nanocjevčica. Ovaj sorbens primijenjen je za ekstrakciju nesteroidnih protuupalnih lijekova iz urina (70).

Magnetske nanočestice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  su primjenjene za istovremenu ekstrakciju losartana, karvedilola i amlodipin besilata iz plazme (71), ali posebno su inovativni sorbensi kod kojih su magnetske nanočestice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  prekrivene s polimerom s molekulskim otiskom u svrhu ekstrakcije kokaina i njegovih metabolita iz urina ovisnika (72), odnosno ekstrakcije 6-merkaptopurina i 6-tiogvanina iz plazme pacijenata oboljelih od leukemije (73).

### Izvedbeni oblici ekstrakcije čvrstom fazom

Kod većine gore opisanih metoda reaktivni sorbens smješten je u staklenom ili plastičnom ulošku. No u svrhu skraćivanja vremena pripreme uzoraka te automatizacije cijelog postupka, moguće je reaktivni sorbens smjestiti i u druge formate poput 96-ekstrakcijskih pločica, nastavaka za automatske pipete, kolona za *on-line* ekstrakciju čvrstom fazom te diskova. Kako bi se pojednostavnio ekstrakcijski postupak te povećala adsorptivna sposobnost reaktivnog sorbensa, ekstrakcija čvrstom fazom primjenjuje se i sa sorbensom koji se nalazi u disperzivnom obliku.

#### 96-ekstrakcijske pločice

96-ekstrakcijske pločice predstavljaju relativno noviji format prikladan za rutinske analize jer omogućavaju istovremenu pripremu čak do 96 uzoraka. Male količine sorbensa (2–100 mg) smještene su u kanalima veličine od 0,5 do 2 mL. Ovako male količine sorbensa smještene u kanalima omogućavaju brži razvoj metode, smanjenu potrošnju organskih otapala te količinu potrebnih uzoraka (3). Upravo zato nije iznenađujuće da veliki broj bioanalitičkih metoda primjenjuje upravo ovaj format ekstrakcije čvrstom fazom (tablica 2.).

#### *On-line* ekstrakcija čvrstom fazom

S obzirom na zahtjeve kliničkih laboratorija za brzim, automatiziranim i reproducibilnim metodama, *on-line* povezivanje ekstrakcije čvrstom fazom i kromatografskih tehnika od iznimnog je značaja u bioanalitici. Kolone za *on-line* ekstrakciju čvrstom fazom sastoje se od vanjske kolone dužine 2–20 mm, unutarnjeg promjera 1–4,6 mm u kojoj je smješten reaktivni sorbens. Na ovaj način se dobivaju uski kromatografski pikovi bez gubitka ili razgradnje analita tijekom prenošenja uzorka, odnosno dobiva se izvanredna pouzdanost bioanalitičkih metoda. Neposrednim povezivanjem postupka pripreme i analize uzorka smanjuje se i mogućnost kontaminacije samog uzorka te se smanjuje i izloženost analitičara opasnom materijalu. Iako se kolone za *on-line* ekstrakciju čvrstom fazom mogu višestruko koristiti, visoka cijena kako analitičke opreme tako i samih kolona i dalje ostaje veliki izazov kliničkim laboratorijima (84).

**Tablica 2.** ► Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korišten format 96-ekstrakcijske pločice

| Analit (terapijska skupina lijeka)   | Vrsta uzorka  | Sorbens   | Karakteristike sorbensa                       | Ekstrakcijska učinkovitost | Literaturni navod |
|--------------------------------------|---------------|---|---|----------------------------|-------------------|
| androstenedion (hormon)              | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 82 %                     | 74                |
| amoksicilin (antibiotik)             | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 69 %                       | 75                |
| ampicilin (antibiotik)               | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 85 %                       | 75                |
| cefadroksil (antibiotik)             | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 96 %                       | 75                |
| cefepim (antibiotik)                 | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 81 %                       | 75                |
| cefuroksim (antibiotik)              | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 73 %                       | 75                |
| ceftazidim (antibiotik)              | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 75 %                       | 75                |
| ciproteron acetat (kontraceptiv)     | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 74 %                     | 74                |
| dasatinib i metaboliti (citostatik)  | plazma        | Oasis HLB® 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | hidrofilni/lipofilni polimer (2 mg)           | ≥ 79 %                     | 76                |
| derivati para-arahidonske kiseline   | plazma, serum | Oasis HLB® 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | hidrofilni/lipofilni polimer (2 mg)           | nije navedeno              | 77                |
| desacetil norgestimat (kontraceptiv) | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 67 %                     | 74                |
| dienogest (kontraceptiv)             | plazma        | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 84 %                     | 74                |

| Analit (terapijska skupina lijeka)         | Vrsta uzorka | Sorbens  | Karakteristike sorbensa                       | Ekstrakcijska učinkovitost | Literaturni navod |
|--|--------------|--|---|----------------------------|-------------------|
| drospirenon (kontraceptiv)                 | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 76 %                     | 74                |
| enalapril (antihipertenziv)                | serum        | Oasis® MAX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama        | ≥ 77 %                     | 78                |
| enalaprilat (aktivni metabolit enalapрила) | serum        | Oasis® MAX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama        | ≥ 93 %                     | 78                |
| etonogestrel (kontraceptiv)                | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 81 %                     | 74                |
| fenoksimetilpenicilin (antibiotik)         | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 52 %                       | 75                |
| flukloksacilin (antibiotik)                | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 74 %                       | 75                |
| gestoden (kontraceptiv)                    | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 81 %                     | 74                |
| kiormadinon acetat (kontraceptiv)          | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 73 %                     | 74                |
| krizotinib (citostatik)                    | plazma       | Oasis HLB® 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | hidrofilni/lipofilni polimer (2 mg)           | ≥ 82 %                     | 79                |
| kortizol (hormon)                          | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 90 %                     | 74                |
| levonorgestrel (kontraceptiv)              | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 84 %                     | 74                |
| medroksiprogesteron acetat (kontraceptiv)  | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | ≥ 68 %                     | 74                |
| meropenem (antibiotik)                     | plazma       | Oasis® MCX 96-ekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg) | 92 %                       | 75                |

| Analit (terapijska skupina lijeka)   | Vrsta uzorka | Sorbens   | Karakteristike sorbensa  | Ekstrakcijska učinkovitost     | Literaturni navod |
|--|--------------|---|--|--------------------------------|-------------------|
| mitramicin (antibiotik)  | plazma       | Evolute® Express ABN (Biotage, Uppsala, Švedska)                        | modificirani polistiren-divinilbenzen polimer s vezanim hidrofilnim hidroksilnim skupinama     | 93 %                           | 80                |
| nomegestrol acetat (kontraceptiv)  | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | ≥ 79 %                         | 74                |
| noretindron (kontraceptiv)   | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | ≥ 87 %                         | 74                |
| piperacilin (antibiotik)   | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | 67 %                           | 75                |
| progesteron (hormon)   | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | ≥ 78 %                         | 74                |
| sugamadeks (modificirani γ-cikloodekstrin koji se koristi za enkapsuliranje rokuronija i vekuronija) | plazma, urin | ISOLUTE® HAX 96-ekstrakcijske pločice (Biotage AB, Uppsala, Švedska)    | modificirani silikagel s vezanim hidrofobnim alkilnim lancima (C8) i kvaternim amino skupinama | ≥ 29 (plazma)<br>≥ 44 % (urin) | 81                |
| tazobaktam (antibiotik)  | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | 13 %                           | 75                |
| testosteron (hormon)   | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama (2 mg)  | ≥ 93 %                         | 74                |
| trantinterol i metaboliti (antiasmatik)  | plazma       | Oasis® MCX 96-μekstrakcijske pločice (Waters Corporation, Milford, SAD) | polimer s vezanim sulfonskim skupinama   | ≥ 82 %                         | 82                |
| vismodegib (potencijalni citostatik)   | plazma       | Strata-X 33 96-ekstrakcijske pločice (Phenomenex, Torrance, CA, SAD)    | modificirani stiren divinilbenzen polimer  | ≥ 79 %                         | 83                |



*On-line* SPE-LC u bioanalitici najčešće se provodi obrnuto faznom ekstrakcijom i kromatografskim razdvajanjem. Uobičajna je primjena ekstrakcijskog sorbensa modificiranog silikagela s vezanim alkilnim lancima s 8 ugljikovih atoma i kromatografskih kolona kod kojih je nepokretna faza modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima s 18 ugljikovih atoma. Upravo ovakav aktivni sorbens sprječava širenje kromatografskih pikova. Hu i suradnici (85) predložili su *on-line* SPE-LC/MS/MS metodu za određivanje kortikosteroida metilprednizolona u plazmi. Nakon uklanjanja proteina metanolom provedena je ekstrakcija analita kolonama HySphere C8 EC-SE (Spark, Emmen, Nizozemska) koje kao sorbens sadrže modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima s 8 ugljikovih atoma i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama. Istim sorbensom ekstrahirani su amlodipin (86) te opojne tvari iz urina ovisnika (87).

Kolona HySphere C18, HD (Spark, Emmen, Nizozemska) kod koje je sorbens modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima i prekrivenim slobodnim silanolnim skupinama korištena je za ekstrakciju fingolimoda i njegova fosforilirana aktivna metabolita iz plazme. Kod ovog sorbensa provedeno je zbijeno prekrivanje silanolnih skupina kako bi mu se smanjila polarnost u odnosu na druge sorbense s modificiranim silikagelom. Ovaj sorbens izabran za ekstrakciju dvaju analita s velikom razlikom u polarnosti. Fingolimod se lako vezuje za ovaj nepolarni sorbens, dok polarni fosforilirani metabolit prolazi kroz sorbens bez zadržavanja. Zadržavanje polarnog analita na sorbensu postpešeno je dodavanjem dimetilheksilamina, reagensa koji tvori ionski par s ionima u otopini (88).

Isti sorbens je našao primjenu i kod određivanja kortizola i kortizona u slini pacijenata (89) te kod praćenja protokola rehidracije sportaša atletičara, budući da je primijenjen za istovremenu ekstrakciju aldosterona i kortizona (90).

Gode i suradnici (91) osmislili su novu *on-line* tehnologiju eluiranja analita sa sorbensa na kromatografsku kolonu kako bi dobili uže kromatografske pikove te povećali djelotvornost kromatografskog razdvajanja. Tehnologiju su testirali na dvije vrste sorbensa, oba modificirana silikagela Acclaim 120 C18 i Acclaim C18 PAII (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) za ekstrakciju 14 različitih antibiotika iz urina ispitanika.

*On-line* ekstrakcija čvrstom fazom povezana s kapilarnom elektroforezom i MS detektorom primjenjena je u svrhu ekstrakcije opioidnih peptida iz plazme pacijenata. Ispitan je niz različitih sorbensa, no najbolja učinkovitost kao i osjetljivost (LOD = 0,1 µg/mL) metode postignuta je Sep Pac C18 (Waters Corporation, Milford, MA, SAD) kolonama (92).

S obzirom na učestalost akutnih predoziranja diazepamom nije iznenađujuće da je razvijen čitav niz metoda za njegovo određivanje u biološkim tekućinama. No, medicinsko osoblje koje prikuplja uzorke nerijetko se susreće s nesu radljivošću pacijenata. Kako bi se postavila točna dijagnoza i kod ovakvih pacijenata Jiang i suradnici (93) predložili su bioanalitičku metodu za određivanje koncentracije diazepamama i njegovih pet polarnih metabolita iz uzorka sline. Ekstrakcija analita čvrstom fazom provedena je na polimeru polidivinil benzenu (HySphere Resin GP, Spark, Emmen, Nizozemska). Konačno je potrebno istaknuti kako je ukupno vrijeme od uzorkovanja do dobivanja rezultata analize bilo oko 21 minutu što omogućava primjenu predložene bioanalitičke metode u hitnim slučajevima.

HySphere Resin GP sorbens primijenjen je i za ekstrakciju oksikodona i njegova tri metabolita iz plazme pacijenata. Sva tri analita u strukturi sadrže amino skupinu te njihova polarnost ovisi o pH medija. Zadržavanje analita na nepolarom sorbensu omogućeno je primjenom amonij acetatnog pufera (pH 9,25). Za razliku od većine sorbensa modificiranih silikagelova, polimerni sorbensi su stabilni u širokom pH području te je polimer polidivinil benzen odbran za ekstrakciju ovih analita (94).

Ekstrakcija 92 bazična lijeka i njihova metabolita iz plazme pacijenata provedena je *on-line* kolonama u kojima je smješten polimerni sorbens Strata-X. Predložena metoda pokazala se iznimno osjetljivom (LOQ vrijednosti bile su od 0,02 do 3,4 mg/mL) te ju je moguće koristiti u praćenju koncentracije lijekova iz skupine antidepresiva, neuroleptika i antikonvulziva (95).

Indakaterol, inhalacijski  $\beta_2$ -agonist dugog djelovanja, koristi se u terapiji kronične opstruktivne plućne bolesti. Iznimno malu količinu farmakološki aktivne tvari moguće je naći u plazmi pacijenta nakon inhalacije te je za praćenje njegove farmakokinetike potrebna osjetljiva bioanalitička metoda. U strukturi sadrži hidrofobne dijelove u obliku benzenskih prstenova i alkanskih lanaca, ali i sekundarni dušikov atom kojeg je moguće pri niskom pH medija lako protonirati. Zbog ovakve strukture za njegovu ekstrakciju čvrstom fazom najprikladniji je sorbens koji objedinjuje mehanizme obrnutih faza i kationskog izmjenjivača. U tu svrhu Emotte i suradnici (96) izabrali su sorbens Oasis MCX te su ekstrahirali analit primjenom *off-line* ali i *on-line* ekstrakcije. Potrebno je istaknuti kako je dobiveno izvanredno podudaranje rezultata analiza bez obzira na primjenjenu tehniku ekstrakcije ( $r = 0,97$ ).

Polimerni sorbensi s molekulskim otiskom rijetko se *on-line* povezuju s tekućinskom kromatografijom zbog slabe kompatibilnosti s najčešće korištenim obrnuto faznim kromatografskim nepokretnim fazama. Ipak, Moein i suradnici

(97) sintetizirali su polimerni sorbens za ekstrakciju antitusika dekstrometorfana iz plazme pacijenata te su 120 mg sorbensa *on-line* povezali s HPLC-om. Ista grupa istraživača potom je sintetizirala i polimerni sorbens za ekstrakciju inzulina također *on-line* povezanog s HPLC-om (98).

Pregledom literature uočeno je kako se sorbensi materijali ograničenog pristupa značajno više koriste u formatu *on-line* kolona nego uložaka. Biotrap 500 MS (Chromtech, Congleton, UK) kolone korištene su za ekstrakciju imunosupresiva takrolimusa iz uzoraka pune krvi transplantiranih pacijenata. Ekstrakcijskim postupkom uspješno je uklonjen hemoglobin iz uzorka te je postignuto ukupno trajanje analize manje od 30 minuta (99). Isti sorbens primijenjen je i za istovremenu ekstrakciju antraciklina i taksana iz seruma pacijenata koji primaju kemoterapiju (100).

Shim-pack MAYI-C8 (G) (Shimadzu, Kyoto, Japan) sorbens se razlikuje od ostalih materijala ograničenog pristupa budući da se sastoji od čestica silikagela (50  $\mu\text{m}$ ) presvučenih s hidrofilnim polimerom dok su samo unutarnje pore silikagela modificirane i prekrivene s alkanskim lancima od 8 ugljikovih atoma. Proteini i ostale makromolekule ne mogu ući u pore čestica te se ne zadržavaju na sorbensu, dok analiti male molekulske mase ulaze u pore te se hidrofobnim interakcijama zadržavaju na sorbensu. Zhong i suradnici (101) primijenili su ovaj inovativni sorbens za ekstrakciju deset antipsihotika iz plazme pacijenata.

Premda imunoafinitetni sorbensi imaju niz već spomenutih nedostataka poput nestabilnosti i visoke cijene, njihova uloga u proteomici je nezamjenjiva. Iznimno zanimljivu *on-line* SPE-nanoLC/MS/MS bioanalitičku metodu predstavili su Neubert i suradnici (102) koja uključuje ukoncentriravanje pepsina/pepsinogena kao biomarkera gastroezofagealnog refluksa imunoafinitetnim sorbensom. Budući da je postignuta izvanredna osjetljivost metode (LLOQ = 4 pmol/L) koncentracija navedenog biomarkera uspješno je određena u uzorcima sline pacijenata.

### Nastavci za automatske pipete

Godine 1998., proizvođač Millipore (Bedford, MA, SAD) predstavio je i još jedan format ekstrakcije čvrstom fazom, *ZipTip*, gdje je reaktivni sorbens smješten u vrhu nastavka za automatske pipete između dva filtera (slika 8.). Kod ovog formata sorbens se miješa s uzorkom te nije potreban korak njegovog kondicioniranja što dodatno skraćuje postupak pripreme uzorka. Među prednostima ove tehnike pripreme uzorka potrebno je istaknuti kratko vrijeme ekstrakcijskog postupka, malu potrošnju otapala, mali volumen uzorka potreban za analizu te mogućnost automatizacije cijelog postupka (3, 4).

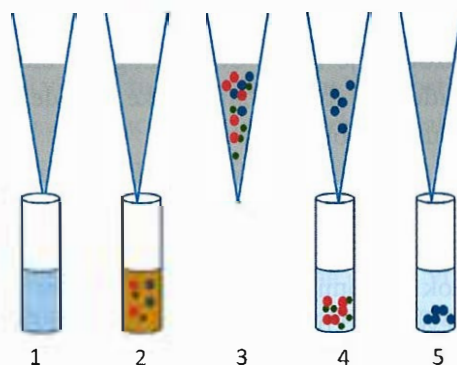
Pored neizostavne točnosti i preciznosti bioanalitičke metode moraju biti prvenstveno brze s obzirom na zahtjeve kliničkih laboratorija za izdavanjem nalaza unutar nekoliko sati. Stoga su Altun i suradnici (103) predložili set od 96 nastavaka za automatske pipete uz primjenu robota za automatiziranu dostavu otapala (Personal Pipettor Robot, PP-550 N-MS, Apricot Design Inc, Covina, CA, SAD). Nastavci za pipete punjeni su reaktivnim sorbentom koji se sastoji od monolitnog metakrilnog polimera. Predloženu metodu primijenili su za određivanje antitumorskih lijekova, betablokatora i lokalnih anestetika u uzorcima plazme.

OMICS C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD) nastavci za automatske pipete, u kojima je smješten monolitni modificirani silikagel kao sorbens, korišteni su za određivanje endokanabinoida u uzorcima plazme (104).

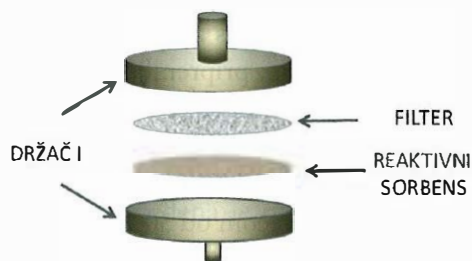
### Diskovi

Sve češće se u bioanalitici primjenjuju i diskovi kod kojih je nosač ugrađen u mrežu staklenih ili PTFE vlakana (slika 9.). Debljina diskova je između 0,5 i 2 mm, promjera su između 4 i 96 mm, a u njima je smještena količina sorbensa od 1,5 do 30 mg. Diskovi i ulošci uglavnom se razlikuju prema omjeru duljine i širine. Dok je taj omjer kod uložaka manji od 1, kod diskova je veći od 1 što omogućava veliku dodirnu površinu između uzorka i sorbensa. Nadalje, potrebno je istaknuti kako su čestice sorbensa kod diskova značajno manje u odnosu na čestice sorbensa koji se koriste kod drugih formata. Gore spomenute prednosti omogućavaju učinkovitije i reproducibilnije zadržavanje analita na sorbentu i pored veće brzine ekstrakcije (3, 4).

S obzirom na to da se diskovi primjenjuju prvenstveno u ekstrakciji analita iz velikih volumena poput



Slika 8. ▶ Ekstrakcija čvrstom fazom primjenom nastavka za automatske pipete: solvatacija sorbensa (1), uzorkovanje (2), miješanje odnosno aspiracija zraka (3), ispiranje interferencijom (4) i elucija analita (5)



Slika 9. ▶ Shematski prikaz strukture diskova.

otpadnih voda i hrane, nije iznenađujuće da ovaj format ekstrakcije čvrstom fazom nije našao svoju ulogu u bioanalitici. Ipak, pretraživanjem literature nađene su dvije bioanalitičke metode u kojima su diskovi primjenjeni za ekstrakciju ksenobiotika iz urina.

SPEC.PLUS.C18AR/MP3 (Ansys Diagnostics Inc, lake Forest, CA, SAD) disk sastoji se od dva sorbena. Gornji je modificirani silikagel kojemu su slobodne silanolne skupine prekrivene alkanskim lancima od 18 ugljikovih atoma, dok je donji sorbens jaki kationski izmjenjivač. Primjenjen je za ekstrakciju devet strukturno različitih lijekova (105) te amfetamina, metamfetamina i njihovih metabolita (106) iz urina pacijenata.

### Disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom

Disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom zasniva se na dodavanju usitnjenog sorbena u uzorak. Premda je danas na tržištu moguće naći velik broj različitih, komercijalno dostupnih sorbena namijenjenih ovom obliku ekstrakcije čvrstom fazom, za bioanalitička ispitivanja su posebno zanimljivi vrlo inovativni sorbensi poput nanomaterijala namijenjenih ekstrakciji različitih analita (70). Najčešće se disperzivna ekstrakcija čvrstom fazom primjenjuje u analitici hrane, no moguće je reći da u ovoj tehnici leži i veliki potencijal za primjenu i u analitici endogenih i egzogenih tvari u biološkim uzorcima (3, 4).

Primjer potencijala tehnike moguće je pronaći u istraživanju koje su proveli Fabrizi i suradnici (107). Za ekstrakciju 13 strukturno različitih antitumorskih lijekova u uzorcima urina pacijenata koristili su disperzivnu ekstrakciju čvrstom fazom. Sorbens za ekstrakciju sastojao se od smjese dva sorbena: polimera *N*-vinilpirolidona te divinilbenzena i modificiranog silikagela s vezanim alkanskim lancem od 18 ugljikovih atoma. Na ovaj način postignut je višestruki mehanizam zadržavanja raznovrsnih analita. Ekstrakcijska učinkovitost bila je od 65 do 102 %, ali je korišten veliki volumen uzorka (10 mL) što se može smatrati nedostatkom tehnike.

Cela-Pérez i suradnici (108) su predstavili sasvim nov oblik ekstrakcije čvrstom fazom. Sorbens za ekstrakciju četiri kanabinoidna spoja, polimer s molekulskim otiskom, pripremljen je u obliku cilindričnih tableta. Akrilamid kao funkcionalni monomer, etilen glikol dimetakrilat kao poveznica te katehin kao molekula predložak korišteni su za pripremu polimera. Tehnika je primjenjena za ekstrakciju spomenutih spojeva iz urina i sline ovisnika s ekstrakcijskom učinkovitošću većom od 50 %.

Različiti disperzivni sorbesni korišteni su za ukljanjanje lipida iz majčina mlijeka u svrhu određivanja ftalata (109).

## Višedimenzionalna ekstrakcija čvrstom fazom

Višedimenzionalna ekstrakcija čvrstom fazom zasigurno je zanimljiv i kreativan oblik pripreme uzorka. Primjenom dvije ili više vrsta sorbensa moguće je postići vrlo selektivno pročišćavanje uzorka kao i ukoncentriravanje samog analita (3–6).

Ferreiro-Vera i suradnici (110) predstavili su iznimno zanimljiv sustav za istovremeno određivanje vitamina D i B<sub>9</sub> te njihovih metabolita u plazmi, urinu i majčinom mlijeku. Vitamin D spada u skupinu lipofilnih vitamina dok je vitamin B<sub>9</sub> hidrofilan. Ekstrakcija čvrstom fazom izvedena je primjenom automatizirane radne postaje Symbiosis™ Pro (Spark Holland, Emmen, Nizozemska) koja je uključivala dvije visoko tlačne pumpe te je selektivna ekstrakcija analita provedena na dvije uzastopno vezane kolone. Vitamin D i njegovi metaboliti prvo su zadržani na obrnuto faznom sorbentu HySphere C18 – EC dok su vitamin B<sub>9</sub> i njegovi metaboliti zadržani na HySphere MM anion sorbentu. Vitamin D i njegovi metaboliti hidrofobni su spojevi koji se lako zadržavaju na obrnuto faznom sorbentu. S druge strane vitamin B<sub>9</sub> i metaboliti imaju hidrofobne fenilne skupine u strukturi te bi se i oni donekle mogli vezati za obrnuto fazni sorbens. Kako bi se spriječilo njihovo zadržavanje na prvom sorbentu uzorci su nanoseni na kolone 30 %-tnim acetonitrilom u kojeg je dodana 0,2 %-tna otopina mravlje kiseline. Na ovaj način vitamin B<sub>9</sub> i metaboliti su se ionizirali i kao takvi nisu se zadržavali na prvom sorbentu. Zadržavanje na drugom sorbentu potaknuto je primjenom fosfatnog pufera. Nakon elucije sa sorbensa pojedina frakcija analizirana je LC/MS/MS tehnikom. Vitamin D i metaboliti analizirani su na Luna C18, a vitamin B<sub>9</sub> i metaboliti na Luna HILIC (Phenomenex, Torrance, CA, SAD) koloni.

## Primjena ekstrakcije čvrstom fazom u kombinaciji s drugim tehnikama pripreme bioloških uzoraka

Bioanalitičke metode moraju biti iznimno selektivne i osjetljive. Ponekad ove visoke zahtjeve nije moguće postići primjenom samo jednog postupka pripreme biološkog uzorka, već se nekoliko tehnika ekstrakcije analita i uklanjanja interferencija uzastopno koriste.

Ekstrakcija čvrstom fazom se vrlo često koristi nakon direktnog taloženja proteina (16, 94). Na ovaj način se postiže i bolja selektivnost metode, ali se i spriječava mogućnost začepeljivanja sorbensa. S druge strane u svega jednoj bioanalitičkoj metodi ekstrakcija čvrstom fazom provedena je nakon ekstrakcije tekuće-tekuće (19).

Posljednjih godina sve veću pažnju u bioanalitici dobiva tehnika uzorkovanja iz suhe kapi krvi (DBS)<sup>8</sup>, ne samo kao tehnika pripreme već i pohrane uzoraka. Li i suradnici (111) predložili su novu metodu za određivanje guanfacina, simpatolitika koji se koristi u terapiji deficita pažnje/hiperaktivnog poremećaja kod djece. Uzorci krvi iz prsta nanesen su na membranski filter (Yorktest Laboratories, York, UK) koji se sastoji od dvije membrane. Gornja membrana zadržava crvene krvne stanice te je omogućila sakupljanje plazme u donjoj membrani. Membrane se potom odlijepe te se na taj način razdvoji plazma od crvenih krvnih stanica. Gotovo u potpunosti automatiziranim sustavom s membrane se eluirao uzorak te je prenesen na kolonu HySphere C18 HD te je direktno eluiran na kromatografsku kolonu. Osim što je predložena DBS-SPE-LC/MS/MS metoda gotovo u potpunosti automatizirana, osjetljiva (LOQ = 0,25 ng/mL) i točna (CV ≤ 12%), potrebno je istaknuti da je i prilagođena za pedijatrijsku populaciju jer je manje invazivna u odnosu na uzorkovanje iz venske krvi. DBS-SPE-LC/MS/MS metoda primjenjena je i za određivanje metabolita azatioprina u svrhu praćenja adherencije pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva (112).

Nekoliko tehnika pripreme uzoraka je potrebno uključiti u razvoj bioanalitičke metode posebice kod iznimno složenih te krutih uzoraka. Tako je tekuća ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom, tehnika ekstrakcije analita otapalima pri povišenoj temperaturi i tlaku, korištena prije ekstrakcije čvrstom fazom za ekstrakciju četiri kanabinoida iz kose ovisnika o marihuani (113) te biomarkera zlouporabe kokaina iz mekonija novorođenčeta ovisnica o opijatnim drogama (114).

## Sažetak

U ovom preglednom radu opisana je tehnika ekstrakcije čvrstom fazom te je prikazana njena primjena u bioanalitici. Rad obuhvaća pregled bioanalitičkih metoda namijenjenih određivanju terapijske doze lijekova te ispitivanju njihove farmakokinetike. Nadalje, opisane su bioanalitičke metode kojima su određuju biomarkeri različitih bolesti, opijatne droge, sintetički stimulanzi i štetne tvari koje se unose prehrambenim i kozmetičkim proizvodima. Navedeni su raznovrsni reaktivni sorbensi od široko komercijalno dostupnih modificiranih silikagela i polimera do visoko selektivnih inovativnih sorbensa poput nanomaterijala, polimera s molekulskim otiskom, imunosorbensa itd. Osim seruma, plazme i urina, istaknute su i metode kojima su analizirane druge

<sup>8</sup> DBS – (engl. *Dried Blood Spot*)

vrste uzoraka poput sline, bronhalnog sekreta, koštane srži, majčinog mlijeka, mekonija i kose. Automatizacija bioanalitičkih metoda je danas imperativ, posebice u kliničkim laboratorijima stoga su obrađene i metode koje koriste formate ekstrakcije čvrstom fazom namijenjene analizi velikog broja uzoraka poput 96-ekstrakcijskih pločica i *on-line* kolona.

## Zaključak

Provedeno istraživanje upućuje na danas sve značajniju ulogu ekstrakcije čvrstom fazom u pripremi bioloških uzoraka. No, ova tehnika će se vrlo vjerojatno u budućnosti i dalje razvijati. Veliki potencijal tehnike leži u osmišljavanju novih inovativnih, visoko selektivnih i stabilnih reaktivnih sorbensa. U rutinskim analizama posebno će biti zanimljivi oni sorbensi kojima će se moći istovremeno ekstrahirati veći broj analita s visokom ekstrakcijskom učinkovitošću. Jedan od vodećih problema u bioanalitici je količina dostupnog uzorka, posebice u neonatologiji i pedijatriji te će naglasak biti na razvoju novih metoda namijenjenih upravo ovakvim uzorcima. Posljednjih godina sve više se govori i piše o važnosti suradljivosti pacijenta u procesu postavljanja dijagnoze i liječenja stoga su posebno vrijedne metode za analizu biološkog materijala poput sline i kose. Sa stajališta pacijenata uzorkovanje ovog biološkog materijala je neinvazivno, no s analitičkog stajališta ovi uzorci su iznimno zahtjevni i složeni.

## Zahvale

Ovaj je rad objavljen u okviru projekta *Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva* kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-UIP-2017-05-3949.

6

2020

## Solid-phase extraction – bioanalytical applications

A. Mornar, B. Nigović, D. Amidžić Klarić, M-L. Jeličić, E. Brusač

**Abstract** In this review article, the technique of solid phase extraction and its application in bioanalytics is described. The article encompasses an overview of bioanalytical methods intended for therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies. Furthermore, bioanalytical methods used in determination of disease markers, opiates, artificial stimulants and



harmful substances absorbed via food and cosmetics are described. Various active sorbents, ranging from readily available modified silicagels and polymers to highly selective innovative sorbents such as nanomaterials, molecular imprinted polymers and immunosorbents are listed. Besides serum, plasma and urine, methods analysing other types of samples such as saliva, bronchial secretion, bone marrow, breast milk, meconium and hair are highlighted. Today, automation of bioanalytical methods is a necessity especially in clinical laboratories, thus methods utilizing solid phase extraction formats intended for analysis of a large number of samples such as 96-well plates and *on-line* columns are covered.

1. Abd-Talib N, Mohd-Setapar SH, Khamis AK. The benefits and limitations of methods development in solid phase extraction: mini review. *Jurnal Teknologi*. 2014; 69:69–72.
2. Knaack J. Solid phase extraction for HPLC-MS/MS clinical analysis: finding a needle in a haystack, *Pharmaceut Anal Acta*. 3; e141.
3. Kole PL, Venkatesh G, Kotecha J, Sheshala R. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods. *Biomed Chromatogr*. 2011; 25:199–217.
4. Singleton C. Recent advances in bioanalytical sample preparation for LC-MS analysis. *Bioanalysis*. 2012; 4:1123–1140.
5. Zwir-Ferenc A, Biziuk M. Solid phase extraction technique – trends, opportunities and applications. *Pol J Environ Stud*. 2006; 15:677–690.
6. Buszewski B, Szultka M. Past, present, and future of solid phase extraction: a review. *Crit Rev Anal Chem*. 2012; 42:198–213.
7. Itohd A, Tsutsumi K, Imai H, Iwao M, Kotegawa T, Ohashi K. Determination of celioprolol in human plasma using high performance liquid chromatography with fluorescence detection for clinical application. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2012; 904:88–92.
8. Chhonkera YS, Edic C, Murryab DJ. LC-MS/MS method for simultaneous determination of diethylcarbamazine, albendazole and albendazole metabolites in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*. 2018; 151:84–90.
9. Papoutsis I, Rizopoulou A, Nikolaou P, Pistos C, Spiliopoulou C, Athanaselis S. A validated GC/MS method for the determination of amisulpride in whole blood. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 947–948:111–116.
10. Kokova D, Dementeva N, Cherdyntseva N, Gratcheva A, Kzhyshkowska J. Detection adducts DNA in human blood and lung cancer tissue by a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer. *Eur J Cancer Suppl*. 2015; 13:27–28.
11. Buscher BA, Jägfeldt H, Sandman H, Brust-van Schaik R, van Schaik F, Brüll LP. The determination of budesonide and fluticasone in human sputum samples collected

- from COPD patients using LC-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 880:6–11.
12. Christoffersen DJ, Brasch-Andersen C, Thomsen JL, Worm-Leonhard M, Damkier P, Brøsen K. Quantification of morphine, morphine 6-glucuronide, buprenorphine, and the enantiomers of methadone by enantioselective mass spectrometric chromatography in whole blood. *Forensic Sci Med Pathol.* 2015; 11:193–201.
  13. Yoshizato T, Tsutsumi K, Kotegawa T, Imai H, Nakano S. Determination of domperidone in human plasma using high performance liquid chromatography with fluorescence detection for clinical application. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014; 961:86–90.
  14. Nikolaou P, Papoutsis I, Spiliopoulou C, Voudris C, Athanaselis S. A fully validated method for the determination of lacosamide in human plasma using gas chromatography with mass spectrometry: application for therapeutic drug monitoring. *J Sep Sci.* 2015; 38:260–266.
  15. Nikolaou P, Papoutsis I, Dona A, Spiliopoulou C, Athanaselis S. Development and validation of a GC/MS method for the simultaneous determination of levetiracetam and lamotrigine in whole blood. *J Pharm Biomed Anal.* 2015; 102:25–32.
  16. Mornar A, Sertić M, Turk N, Nigović B, Koršić M. Simultaneous analysis of mitotane and its main metabolites in human blood and urine samples by SPE-HPLC technique. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26:1308–1314.
  17. Nobilis M, Vybíralová Z, Szotáková B, Sládková K, Kuneš M, Svoboda Z. High-performance liquid chromatographic determination of tiapride and its phase I metabolite in blood plasma using tandem UV photodiode-array and fluorescence detection. *J Chromatogr B.* 2011; 879:3845–3852.
  18. Wiegand R, Wu J, Shields AF, Lorusso P, Li J. Simultaneous determination of 1-(2'-deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl) uracil (FAU) and 1-(2'-deoxy-2'-fluoro- $\beta$ -D-arabinofuranosyl) 5-methyluracil (FMAU) in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 891–892:64–70.
  19. van de Merbel NC, Bronsema KJ, van Hout MW, Nilsson R, Sillén H. A validated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitative determination of 4 $\beta$ -hydroxycholesterol in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 55:1089–1095.
  20. Fernandez-Torres R, Consentino MO, Lopez MA, Mochon MC. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography-diode array-fluorescence (HPLC-DAD-FLD) in human urine samples. *Talanta.* 2010; 81:871–880.
  21. Gabler J, Miller A, Wang S. A simple liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for measuring metanephrine and normetanephrine in urine. *Clin Chem Lab Med.* 2011; 49:1213–1216.

22. Gabler J, Wang S. Quantification of metanephrine and normetanephrine in urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods Mol Biol.* 2016; 1378:149–57.
23. Parekh JM, Shah DK, Sanyal M, Yadav M, Shrivastav PS. Development of an SPE-LC-MS/MS method for simultaneous quantification of bosentan and its active metabolite hydroxybosentan in human plasma to support a bioequivalence study. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 70:462–470.
24. Page-Sharp M, Ilett KF, Betuela I, Davis TM, Batty KT. Simultaneous determination of primaquine and carboxyprimaquine in plasma using solid phase extraction and LC-MS assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 902:142–146.
25. Qin F, Wang Y, Wang L, Zhao L, Pan L, Cheng M, Li F. Determination of trantinterol enantiomers in human plasma by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using vancomycin chiral stationary phase and solid phase extraction and stereoselective pharmacokinetic application. *Chirality.* 2015; 27:327–231.
26. Qin F, Wang L, Li K, Xiong Z, Li F. Simultaneous quantification of trantinterol and its metabolites in human urine by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2015; 997:64–69.
27. Qin F, Yin B, Wang L, Li K, Li F, Xiong Z. Quantification of trantinterol, its two metabolites and their primary conjugated metabolites in human plasma by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 117:413–418.
28. Nannetti G, Pagni S, Parisi SG, Alberti A, Loregian A, Palù G. Development of a simple HPLC-UV method for the determination of the hepatitis C virus inhibitor simeprevir in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2016; 121:197–203.
29. Tonooka K, Naruki N, Honma K, Agei K, Okutsu M, Hosono T, Kunisue Y, Terada M, Tomobe K, Shinozuka T. Sensitive liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of nine local anesthetic drugs. *Forensic Sci Int.* 2016; 265:182–185.
30. Djordjević S, Jović-Stosić J, Kilibarda V, Segrt Z, Perković-Vukčević N. Determination of flumazenil in serum by liquid chromatography-mass spectrometry: Application to kinetics study in acute diazepam overdose. *Vojnosanit Pregl.* 2016; 73:146–151.
31. Shapiro GI, Rodon J, Bedell C, Kwak EL, Baselga J, Braña I, Pandya SS, Scheffold C, Laird AD, Nguyen LT, Xu Y, Egile C, Edelman G. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of SAR245408 (XL147), an oral pan-class I PI3K inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res.* 2014; 20:233–245.
32. Shah JV, Parekh JM, Shah PA, Shah PV, Sanyal M, Shrivastav PS. Application of an LC-MS/MS method for the analysis of amlodipine, valsartan and hydrochlorothiazide in polypill for a bioequivalence study. *J Pharm Anal.* 2017; 7(5):309–316.

33. López-Guarnido O, Álvarez I, Gil F, Rodrigo L, Cataño HC, Bermejo AM, Tabernero MJ, Pla A, Hernández AF. Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: criteria to quantitatively assess cocaine use. *J Appl Toxicol.* 2013; 33:838–844.
34. Patel B, Suhagia BN, Jangid AG, Mistri HN, Desai N. Systematic evaluation of matrix effect and cross-talk-free method for simultaneous determination of zolmitriptan and N-desmethyl zolmitriptan in human plasma: a sensitive LC-MS/MS method validation and its application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2016; 30:447–458.
35. Patel DP, Sharma P, Sanyal M, Shrivastav PS. SPE-UPLC-MS/MS method for sensitive and rapid determination of aripiprazole in human plasma to support a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013; 925:20–25.
36. Patel DP, Sharma P, Sanyal M, Singhal P, Shrivastav PS. Challenges in the simultaneous quantitation of sumatriptan and naproxen in human plasma: application to a bioequivalence study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 902:122–131.
37. Stratford MR, Folkes LK. Quantitative determination of the anticancer prodrug combretastatin A1 phosphate (OXi4503, CA1P), the active CA1 and its glucuronide metabolites in human urine and of CA1 in plasma by HPLC with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 898:1–6.
38. Patel DS, Sharma N, Patel MC, Patel BN, Shrivastav PS, Sanyal M. Quantitation of nitrofurantoin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Acta Pharm.* 2013; 63:141–158.
39. Patel DP, Sharma P, Sanyal M, Singhal P, Shrivastav PS. Highly sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nifedipine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Biomed Chromatogr.* 2012; 26:1509–1518.
40. Deshpande AY, Gurav S, Punde R, Zambre V, Kulkarni R, Pandey S, Mungantiwar A, Mullangi R. Development and validation of a highly sensitive LC-MS/MS method for simultaneous quantitation of ethionamide and ethionamide sulfoxide in human plasma: application to a human pharmacokinetic study. *Biomed Chromatogr.* 2011; 25:985–994.
41. Abbas Moussa B, Mahrouse MA, Fawzy MG. A validated LC-MS/MS method for simultaneous determination of linagliptin and metformin in spiked human plasma coupled with solid phase extraction: Application to a pharmacokinetic study in healthy volunteers. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 163:153–161.
42. Saibaba SV, Pilli NR, Bimireddy BPK, Pandiyan PS. A novel and rapid LC-MS/MS assay method for the determination of canagliflozin in human plasma by solid phase extraction technique and its application to a pharmacokinetic study. *Future J Pharm Sci.* 2018; 4(2):131–138.
43. Nakov N, Mladenovska K, Labacevski N, Dimovski A, Petkovska R, Dimitrovska A, Kavrakovski Z. Development and validation of automated SPE-LC-MS/MS method

- for determination of indapamide in human whole blood and its application to real study samples. *Biomed Chromatogr.* 2013; 27:1540–1546.
44. Yadav M, Trivedi V, Upadhyay V, Shah G, Baxi GA, Goswami S, Shrivastav PS. Comparison of extraction procedures for assessment of matrix effect for selective and reliable determination of atazanavir in human plasma by LC-ESI-MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 885–886:138–149.
  45. Upadhyay V, Trivedi V, Shah G, Yadav M, Shrivastav PS. Rapid and sensitive UPLC-MS-MS determination of tacrolimus in Wistar rats and human blood. *J Chromatogr Sci.* 2014; 52:59–67.
  46. Tonic-Ribarska J, Haxhiu A, Sterjev Z, Kiteva G, Suturkova L, Trajkovic-Jolevska S. Development and validation of a bioanalytical LC-UV method with solid-phase extraction for determination of valproic acid in saliva. *Acta Pharm.* 2012; 62:211–220.
  47. Dalsgaard PW, Rasmussen BS, Müller IB, Linnet K. Toxicological screening of basic drugs in whole blood using UPLC-TOF-MS. *Drug Test Anal.* 2012; 4:313–319.
  48. Lecomte F, Hubert C, Demarche S, De Bleye C, Dispas A, Jost M, Franken F, Ceccato A, Rozet E, Hubert P. Comparison of the quantitative performances and measurement uncertainty estimates obtained during method validation versus routine applications of a novel hydrophilic interaction chromatography method for the determination of cidofovir in human plasma. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 57:153–165.
  49. da Fonseca BM, Moreno IE, Magalhães AR, Barroso M, Queiroz JA, Ravara S, Calheiros J, Gallardo E. Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 889–890:116–122.
  50. Gudlawar SK, Pilli NR, Siddiraju S, Dwivedi J. Highly sensitive assay for the determination of therapeutic peptide desmopressin in human plasma by UPLC-MS/MS. *J Pharm Anal.* 2017; 7(3):196–202.
  51. Iqbal Z, Elliott M, Watson DG, Holyoake T, Jørgensen H. Analysis of imatinib in bone marrow and plasma samples of chronic myeloid leukaemia patients using solid phase extraction LC-ESI-MS. *Pak J Pharm Sci.* 2011; 24:285–291.
  52. Tomková J, Ondra P, Válka I. Simultaneous determination of mushroom toxins  $\alpha$ -amanitin,  $\beta$ -amanitin and muscarine in human urine by solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with ultra-high-resolution TOF mass spectrometry. *Forensic Sci Int.* 2015; 251:209–213.
  53. Wang HX, Wang B, Zhou Y, Jiang QW. Rapid and sensitive analysis of phthalate metabolites, bisphenol A, and endogenous steroid hormones in human urine by mixed-mode solid-phase extraction, dansylation, and ultra-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405:4313–4319.
  54. Cheong WJ, Yang SH, Ali F. Molecular imprinted polymers for separation science: a review of reviews. *J Sep Sci.* 2013; 36:609–628.

55. Javanbakht M, Attaran AM, Namjumanesh MH, Esfandyari-Manesh M, Akbari-Adergani B. Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-compatible molecularly imprinted polymer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878:1700–1706.
56. Serrano M, Bartolomé M, Gallego-Picó A, Garcinuño RM, Bravo JC, Fernández P. Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the isolation of 1-hydroxypyrene in human urine. *Talanta.* 2015; 143:71–76.
57. Vitor RV, Martins MC, Figueiredo EC, Martins I. Application of molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for salivary cotinine. *Anal Bioanal Chem.* 2011; 400:2109–2117.
58. García Becerra C, Baez F, Lucangioli S, Flor S, Tripodi V. Miniaturized imprinted solid phase extraction to the selective analysis of Coenzyme Q10 in urine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019; 1116:24–29.
59. Hasanah AN, Rahayu D, Pratiwi R, Rostinawati T, Megantara S, Saputri FA, Puspangara KH. Extraction of atenolol from spiked blood serum using a molecularly imprinted polymer sorbent obtained by precipitation polymerization. *Heliyon.* 2019; 5(4):e01533.
60. Bhatia T, Gupta MK, Singh P, Chauhan A, Saxena PN, Mudiam MK. Sol-gel approach for extracting highly versatile aspirin and its metabolites using MISPE followed by GC-MS/MS analysis. *Bioanalysis.* 2016; 8:795–805.
61. Boonjob W, Sklenářová H, Lara FJ, García-Campaña AM, Solich P. Retention and selectivity of basic drugs on solid-phase extraction sorbents: application to direct determination of  $\beta$ -blockers in urine. *Anal Bioanal Chem.* 2014; 406:4207–4215.
62. Kumazawa T, Hasegawa C, Hara K, Uchigasaki S, Lee XP, Seno H, Suzuki O, Sato K. Molecularly imprinted solid-phase extraction for the selective determination of methamphetamine, amphetamine, and methylenedioxyphenylalkylamine designer drugs in human whole blood by gas chromatography-mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2012; 35:726–733.
63. Silvestro L, Gheorghe MC, Tarcomnicu I, Savu S, Savu SR, Iordachescu A, Dulea C. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma. Use of incurred samples to test back-conversion. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878:3134–3142.
64. Jiang H, Zhang Y, Ida M, LaFayette A, Fast DM. Determination of carboplatin in human plasma using HybridSPE-precipitation along with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879:2162–2170.
65. Schedl M, Wilharm G, Achatz S, Kettrup A, Niessner R, Knopp D. Monitoring polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in human urine: extraction and purification with a sol-gel glass immunosorbent. *Anal Chem.* 2001; 73:5669–5676.

66. Madru B, Chapuis-Hugon F, Peyrin E, Pichon V. Determination of cocaine in human plasma by selective solid-phase extraction using an aptamer-based sorbent. *Anal Chem.* 2009; 81:7081–7086.
67. Ye L, Wang Q, Xu J, Shi ZG, Xu L. Restricted-access nanoparticles for magnetic solid-phase extraction of steroid hormones from environmental and biological samples. *J Chromatogr A.* 2012; 1244:46–54.
68. Hu B, He M, Chen B. Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements. *Anal Bioanal Chem.* 2015; 407:2685–2710.
69. González-Sálamo J, Herrera-Herrera AV, Fanali C, Hernández-Borges J, Magnetic nanoparticles for solid-phase extraction, *LCGC Europe.* 2016; 29:180–192.
70. Suárez B, Simonet BM, Cárdenas S, Valcárcel M. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by combining an immobilized carboxylated carbon nanotubes minicolumn for solid-phase extraction with capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2007; 1159:203–207.
71. Heidari H, Limouei-Khosrowshahi B. Magnetic solid phase extraction with carbon-coated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles coupled to HPLC-UV for the simultaneous determination of losartan, carvedilol, and amlodipine besylate in plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2019; 1114–1115:24–30.
72. Sánchez-González J, Jesús Tabernero M, María Bermejo A, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Development of magnetic molecularly imprinted polymers for solid phase extraction of cocaine and metabolites in urine before high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2016; 147:641–649.
73. Attallah OA, Al-Ghobashy MA, Ayoub AT, Nebsen M. Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for simultaneous extraction and determination of 6-mercaptopurine and its active metabolite thioguanine in human plasma. *J Chromatogr A.* 2018; 1561:28–38.
74. Laszlo CF, Montoya JP, Shamseddin M, de Martin F, Beguin A, Nellen R, Bruce SJ, Mon M. A high resolution LC–MS targeted method for the concomitant analysis of 11 contraceptive progestins and 4 steroids. *J Pharm Biomed Anal.* 2019; 175:112756.
75. Colin P, De Bock L, Tjollly H, Boussery K, Van Boclaer J. Development and validation of a fast and uniform approach to quantify  $\beta$ -lactam antibiotics in human plasma by solid phase extraction-liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry. *Talanta.* 2013; 103:285–293.
76. Furlong MT, Agrawal S, Hawthorne D, Lago M, Unger S, Krueger L, Stouffer B. A validated LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of the anti-leukemic agent dasatinib and two pharmacologically active metabolites in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 58:130–135.
77. Long A, Zhong G, Li Q, Lin N, Zhan X, Lu S, Zhu Y, Jiang L, Tan L. Detection of 19 types of para-arachidonic acids in five types of plasma/serum by ultra performance

- liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8:9248–9256.
78. Burckhardt BB, Laeer S. Sample preparation and extraction in small sample volumes suitable for pediatric clinical studies: challenges, advances, and experiences of a bioanalytical HPLC-MS/MS method validation using enalapril and enalaprilat. *Int J Anal Chem*. 2015; 796249, 1–11.
  79. Roberts MS, Turner DC, Broniscer A, Stewart CF. Determination of crizotinib in human and mouse plasma by liquid chromatography electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC-ESI–MS/MS). *J Chromatogr B*. 2014; 960:151–157.
  80. Roth J, Peer CJ, Widemann B, Cole DE, Ershler R, Helman L, Schrupp D, Figg WD. Quantitative determination of mithramycin in human plasma by a novel, sensitive ultra-HPLC-MS/MS method for clinical pharmacokinetic application. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 970:95–101.
  81. de Zwart MA, ten Bruggencate-Broeders J, van Hal HJ, Megens RH, Frasa HW. Determination of sugammadex in human plasma, urine, and dialysate using a high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011; 879:1573–1586.
  82. Huang J, Lu Y, Wan Q, Zhang M, Pei Q, Zhang M, Liu G, Yang G. Simultaneous determination of trantinterol and one of its major metabolites, 1-carbonyl trantinterol, in human plasma by LC-MS-MS. *J Chromatogr Sci*. 2015; 53:1303–1309.
  83. Deng Y, Wong H, Graham RA, Liu W, Shen HS, Shi Y, Wang L, Meng M, Malhi V, Ding X, Dean B. Determination of unbound vismodegib (GDC-0449) concentration in human plasma using rapid equilibrium dialysis followed by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011; 879:2119–2126.
  84. Rogeberg M, Malerod H, Roberg-Larsen H, Aass C, Wilson SR. On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *J Pharm Biomed Anal*. 2014; 87:120–129.
  85. Hu X, Zheng Y, Wu G, Liu J, Chen J, Huang M, Zhou H, Wu L, Shen-Tu J. An economical online solid-phase extraction LC-MS/MS method for quantifying methylprednisolone. *J Chromatogr Sci*. 2015; 53:1013–1019.
  86. Shentu J, Fu L, Zhou H, Hu XJ, Liu J, Chen J, Wu G. Determination of amlodipine in human plasma using automated online solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry: application to a bioequivalence study of Chinese volunteers. *J Pharm Biomed Anal*. 2012; 70:614–618.
  87. Jagerdeo E, Montgomery MA, Karas RP, Sibum M. A fast method for screening and/or quantitation of tetrahydrocannabinol and metabolites in urine by automated SPE/I.C/MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2010; 398:329–338.
  88. Emotte C, Deglave F, Heudi O, Picard F, Kretz O. Fast simultaneous quantitative analysis of FTY720 and its metabolite FTY720-P in human blood by on-line solid



- phase extraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2012; 58:102–112.
89. Jones RL, Owen LJ, Adaway JE, Keevil BG. Simultaneous analysis of cortisol and cortisone in saliva using XLC-MS/MS for fully automated online solid phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 881–882:42–48.
  90. Taylor PJ, van Rosendal SP, Coombes JS, Gordon RD, Stowasser M. Simultaneous measurement of aldosterone and cortisol by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to dehydration-rehydration studies. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878:1195–1198.
  91. Gode D, Martin MM, Steiner F, Huber CG, Volmer DA. Rapid narrow band elution for on-line SPE using a novel solvent plug injection technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404:433–445.
  92. Benavente F, Medina-Casanellas S, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Investigation of commercial sorbents for the analysis of opioid peptides in human plasma by on-line SPE-CE. *J Sep Sci.* 2010; 33:1294–1304.
  93. Jiang F, Rao Y, Wang R, Johansen SS, Ni C, Liang C, Zheng S, Ye H, Zhang Y. Sensitive, automatic method for the determination of diazepam and its five metabolites in human oral fluid by online solid-phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2016; 10:1873–1883.
  94. Wagner M, Bourgogne E, Varesio E, Hopfgartner G. Quantitation of polar analytes using column-switching: application to oxycodone and three metabolites in human plasma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2010; 878:637–644.
  95. Mut L, Grobosch T, Binscheck-Domaß T, Frenzel W. Toxicological screening of human plasma by on-line SPE-HPLC-DAD: identification and quantification of basic drugs and metabolites. *Biomed Chromatogr.* 2015; 29:935–952.
  96. Emotte C, Heudi O, Deglave F, Bonvie A, Masson L, Picard F, Chaturvedi A, Majumdar T, Agarwal A, Woessner R, Kretz O. Validation of an on-line solid phase extraction method coupled to liquid chromatography-tandem mass spectrometry detection for the determination of Indacaterol in human serum. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2012; 895–896:1–9.
  97. Moein MM, Javanbakht M, Akbari-Adergani B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of dextromethorphan in human plasma samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2011; 879:777–782.
  98. Moein MM, Javanbakht M, Akbari-adergani B. Molecularly imprinted polymer cartridges coupled on-line with high performance liquid chromatography for simple and rapid analysis of human insulin in plasma and pharmaceutical formulations. *Talanta.* 2014; 121:30–36.
  99. Neu V, Delmotte N, Kobold U, Dülffer T, Herrmann R, von der Eltz H, Huber CG. On-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography-tandem

mass spectrometry for the quantitative analysis of tacrolimus in whole blood hemolyzate. *Anal Bioanal Chem.* 2012; 404:863–874.

100. Bermingham S, O'Connor R, Regan F, McMahon GP. Simultaneous determination of anthracyclines and taxanes in human serum using online sample extraction coupled to high performance liquid chromatography with UV detection. *J Sep Sci.* 2010; 33:1571–1579.
101. Zhong Q, Shen L, Liu J, Yu D, Li S, Li Z, Yao J, Huang T, Kawano SI, Hashi Y, Zhou T. Automatic on-line solid-phase extraction with ultra high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of ten antipsychotics in human plasma. *J Sep Sci.* 2016; 39(11):2129–2137.
102. Neubert H, Gale J, Muirhead D. Online high-flow peptide immunoaffinity enrichment and nanoflow LC-MS/MS: assay development for total salivary pepsin/pepsinogen. *Clin Chem.* 2010; 56:1413–1423.
103. Altun Z, Skoglund C, Abdel-Rehim M. Monolithic methacrylate packed 96-tips for high throughput bioanalysis. *J Chromatogr A.* 2010; 1217:2581–2588.
104. Sergi M, Battista N, Montesano C, Curini R, Maccarrone M, Compagnone D. Determination of the two major endocannabinoids in human plasma by  $\mu$ -SPE followed by HPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2013; 405:785–793.
105. de Zeeuw RA, Wijsbeek J, Franke JP. SPEC disc solid-phase extraction for rapid broad-spectrum drug screening in urine. *J Anal Toxicol.* 2000; 24:97–101.
106. Huang Z, Zhang S. Confirmation of amphetamine, methamphetamine, MDA and MDMA in urine samples using disk solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry after immunoassay screening. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003; 792:241–247.
107. Fabrizi G, Fioretti M, Mainero Rocca L. Dispersive solid phase extraction procedure coupled to UPLC-ESI-MS/MS analysis for the simultaneous determination of thirteen cytotoxic drugs in human urine. *Biomed Chromatogr.* 2016; 8:1297–1308.
108. Cela-Pérez MC, Bates F, Jiménez-Morigosa C, Lendoiro E, de Castro A, Cruz A, López-Rivadulla M, López-Vilariño JM, González-Rodríguez MV. Water-compatible imprinted pills for sensitive determination of cannabinoids in urine and oral fluid. *J Chromatogr A.* 2016; 1429:53–64.
109. An J, Kim YY, Cho HD, Kim J, Lee JY, Lee Y, Jo E, Lee J, Cha S, Han SB. Development and investigation of a QuEChERS-based method for determination of phthalate metabolites in human milk. *J Pharm Biomed Anal.* 2020; 181:113092.
110. Ferreiro-Vera C, Priego-Capote F, Luque de Castro MD. An approach for quantitative analysis of vitamins D and B9 and their metabolites in human biofluids by on-line orthogonal sample preparation and sequential mass spectrometry detection. *Analyst.* 2013; 138:2146–2155.
111. Li Y, Henion J, Abbott R, Wang P. The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2012; 26:1208–1212.

112. Alsous MM, Hawwa AF, McElnay JC. Determination of azathioprine/6-mercaptopurine metabolites in dried blood spots: Correlation with RBC concentrations. *J Pharm Biomed Anal.* 2020; 178:112870.
113. Montesano C, Simeoni MC, Vannutelli G, Gregori A, Ripani L, Sergi M, Compagnone D, Curini R. Pressurized liquid extraction for the determination of cannabinoids and metabolites in hair: Detection of cut-off values by high performance liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2015; 1406:192–200.
114. Mantovani CC, Lima MB, Oliveira CD, Menck RA, Diniz EM, Yonamine M. Development and practical application of accelerated solvent extraction for the isolation of cocaine/crack biomarkers in meconium samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2014; 957:14–23.

*Primljeno 14. veljače 2020.*