

# Inovativne tehnike pripreme uzoraka u bioanalitici

---

**Marinac-Andić, Iva**

**Professional thesis / Završni specijalistički**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:478326>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-29**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

**Iva Marinac-Andić**

**INOVATIVNE TEHNIKE PRIPREME UZORAKA U BIOANALITICI**

**Specijalistički rad**

Zagreb, 2021.

Poslijediplomski specijalistički studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Specijalistički rad obranjen je dana 28. rujna 2021. godine na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, pred povjerenstvom u sastavu:

1. dr.sc. Daniela Amidžić Klarić  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
2. prof.dr.sc Ana Mornar Turk  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
3. dr.sc. Biserka Cetina-Čižmek, znanstvena savjetnica  
Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Rad ima 88 listova.

## PREDGOVOR

Ovaj specijalistički rad prijavljen je na Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu i izrađen na Zavodu za analitiku i kontrolu lijekova pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ane Mornar Turk. Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (projekt: Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva, HRZZ-UIP-2017-05-3949).

*Dragoj mentorici, Ani Mornar Turk veliko hvala na stručnoj pomoći i savjetima prilikom izrade ovog specijalističkog rada. Obitelji i prijateljima, hvala na razumijevanju i podršci. Tata, hvala ti što uvijek vjeruješ u mene...*

## **SAŽETAK**

### **Cilj istraživanja**

Cilj ovog istraživanja je prezentirati trenutna dostignuća naprednih tehnika koje se koriste u pripremi uzorka u bioanalitici. U ovom radu bit će prikazana klasifikacija navedenih tehnika, principi izvedbe kao i osvrt na njihove prednosti i nedostatke u odnosu na standardne tehnike poput SPE i LLE. Na kraju, kroz kritički osvrt odabranih znanstvenih radova procijenit će se njihova primjena u bioanalitici.

### **Materijali i metode**

U svrhu izrade ovog specijalističkog rada pretraživat će se relevantna znanstvena i stručna literatura u bibliografskim bazama podataka (*PubMed, Web of Science, ScienceDirect i Scopus*) primjenom sljedećih ključnih riječi: *bioanalysis, sample preparation, bioanalytical methods, bioanalytical techniques, microextraction techniques*. Isto tako će se pregledati knjige i mrežne stranice koje obrađuju navedenu problematiku.

### **Rezultati**

U ovom preglednom radu opisana je i klinički razmotrena primjena različitih vrsta tehnika mikroekstrakcije za ukoncentriravanje različitih spojeva u biološkim uzorcima. Navedeni uzorci imaju vrlo složene matrice koje mogu interferirati u ovakvim analizama. Tijekom razvoja bioanalitičkih metoda ključni parametri su njihova osjetljivost i ekstrakcijska učinkovitost, s obzirom na očekivane niske koncentracije analita u biološkim uzorcima. Posljednjih godina znatno se povećala upotreba mikroekstrakcije u bioanalitici, i to najviše za određivanje

terapijske doze lijekova, kao i farmakokinetička i metabolomička ispitivanja. Ove tehnike omogućuju automatizaciju, minijaturizaciju i visoku učinkovitost analitičkih metoda, a također skraćuju ukupno vrijeme analize. Uz to, mogu se povezati s mnogim analitičkim instrumentima, što dodatno proširuje njihovu primjenu za ekstrakciju različitih spojeva. Navedene značajke otvorile su i nove mogućnosti primjene za razne *in vitro* i *in vivo* studije.

### **Zaključak**

Nužno provesti još više istraživanja kako bi se otkrile sve prednosti i ograničenja ovih tehnika, ali bez sumnje njihov razvoj nastavit će se i u budućnosti u smislu još osjetljivijih i selektivnijih ekstrakcijskih faza što može dovesti do daljnje minijaturizacije ovih tehnika, kao i veće automatizacije pripreme uzoraka.

## **SUMMARY**

### **Objectives**

The aim of this research is to present the current achievements of advanced techniques used in sample preparation in bioanalytics. This paper will present the classification of these techniques, and the principles of performance as well as a review of their advantages and disadvantages compared to standard techniques such as SPE and LLE. Finally, through a critical review of selected scientific papers, their application in bioanalytics will be assessed.

### **Materials and Methods**

For the purpose of this paper, relevant scientific and professional literature in bibliographic databases (PubMed, Web of Science, ScienceDirect and Scopus) will be searched using the following keywords: bioanalysis, sample preparation, bioanalytical methods, bioanalytical techniques, microextraction techniques. Books and websites that address this issue will also be reviewed.

### **Results**

This review describes and clinically considers the application of different types of microextraction techniques to concentrate different compounds in biological samples. These samples have very complex matrices that can interfere in such analyzes. During the development of bioanalytical methods, the key parameters are their sensitivity and extraction efficiency, given the expected low concentrations of analytes in biological samples. In recent years, the use of microextraction in bioanalytics has increased significantly, mostly for determining the therapeutic dose of drugs, as well as pharmacokinetic and metabolomic

studies. These techniques enable automation, miniaturization, high efficiency of analytical methods, and also shorten the total analysis time. In addition, they can be combined with many analytical instruments, which further expands their application for the extraction of various compounds. These features have opened up new applications for various *in vitro* and *in vivo* studies.

### **Conclusion**

More research is needed to discover all the advantages and limitations of these techniques, but no doubt their development will continue in the future in terms of even more sensitive and selective extraction phases, which may lead to further miniaturization of these techniques and greater automation of sample preparation.



## SADRŽAJ

<b>1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA</b> .....	1
<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b> .....	4
<b>3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNAJA O TEMI</b> .....	6
<b>3.1. Osnovna načela i klasifikacija tehnika mikroekstrakcije</b> .....	7
<b>3.2. Mikroekstrakcija na čvrstom nosaču</b> .....	10
3.2.1. Podjela mikroekstrakcija na čvrstom nosaču .....	13
3.2.1.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno .....	13
3.2.1.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na magnet.....	15
3.2.1.3. Mikroekstrakcija tankim filmom .....	18
3.2.1.4. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari.....	19
3.2.1.5. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u igli .....	21
3.2.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete .....	23
<b>3.3. Mikroekstrakcija tekućom fazom</b> .....	24
3.3.1 Podjela mikroekstrakcija tekućom fazom .....	24
3.3.1.1 Mikroekstrakcija jednom kapi .....	25
3.3.1.2 Membranom potpomognuta mikroekstrakcija.....	27
3.3.1.3 Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće.....	29
<b>4. RASPRAVA</b> .....	31

<b>4.1. Odabrani primjeri tehnika mikroekstrakcije na čvrstom nosaču .....</b>	<b>32</b>
4.1.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno .....	32
4.1.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na magnet .....	40
4.1.3. Mikroekstrakcija tankim filmom.....	43
4.1.4. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari.....	46
4.1.5. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u igli.....	50
4.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete.....	55
<b>4.2. Odabrani primjeri tehnika mikroekstrakcije tekućom fazom.....</b>	<b>56</b>
4.2.1. Mikroekstrakcija jednom kapi .....	58
4.2.2. Membranom potpomognuta mikroekstrakcija.....	60
4.2.3. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće.....	62
<b>5. ZAKLJUČAK.....</b>	<b>64</b>
<b>6. LITERATURA.....</b>	<b>66</b>
<b>7. ŽIVOTOPIS.....</b>	<b>76</b>

## **1. UVOD I PREGLED PODRUČJA ISTRAŽIVANJA**

Bioanalitika je pojam koji se općenito koristi za opisivanje kvalitativne i kvantitativne analize endobiotika i ksenobiotika te njihovih metabolita u biološkim tekućinama, prvenstveno u uzorcima krvi, plazme, seruma, urina ili tkiva. Bioanalitička metoda obuhvaća dva osnovna postupka: pripremu uzorka te njegovu analizu. Razvoj bioanalitičkih metoda ide u smjeru postizanja metoda visoke selektivnosti budući da se analiziraju uzorci prisutni u složenim matricama. Osjetljivost metode je također ključan parametar budući da su analiti vrlo često prisutni u niskim koncentracijama u biološkom uzorku. Budući da je cilj razvoja ovih metoda njihova implementacija u rutinskim analizama u kliničkim laboratorijima one moraju biti i ekonomski i ekološki prihvatljive, prikladne za rutinske analize te temeljem toga i robusne.

Tijekom odabira načina uzorkovanja i vrste uzorka, ukoliko farmakokinetičke osobine endobiotika i ksenobiotika dopuštaju, poželjno je uzimanje onih uzoraka koji se prikupljaju neinvazivnim putem poput kose, sline i urina. Ukoliko se ispitivanja provode na animalnim modelima, prikladnost metode za analizu malih volumena poželjna je kako bi se žrtvovao manji broj životinja, odnosno podaci o farmakokinetičkom profilu lijeka dobili iz iste životinje.

Analitičke tehnike koje se koriste u bioanalitici se ubrajaju u napredne instrumentalne tehnike. Spektroskopski testovi, imunološki testovi te elektrokemijske metode zadovoljavaju kriterije brzog probira (engl. *high throughput*) kao i primjene u rutinskim analizama. S druge strane, za postizanje visoke selektivnosti te niske osjetljivosti metode koristi se vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC/MS). Nešto rjeđe se koriste separacijske tehnike poput vezanog sustava plinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*, GC/MS) te kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije (engl. *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*, CE/MS). Vezani sustav superkritične kromatografije i masene

spektrometrije (engl. *Supercritical Chromatography Mass Spectrometry*, SFC/MS) se također koristi u bioanalitici, premda iznimno rijetko (1,2).

Većina analitičara će se složiti kako priprema bioloških uzoraka uzima najviše vremena. Ovi uzorci su složenog sastava, u njima se nalaze interferencije poput proteina i fosfolipida koje s jedne strane mogu smanjiti osjetljivost metode, a s druge skratiti životni vijek kolona za gore navedene separacijske tehnike. Ciljevi pripreme uzoraka su uklanjanje interferencija i / ili ukoncentriravanje analita radi poboljšanja selektivnosti i osjetljivosti metode.

U novije vrijeme razvijen je niz tehnika koje se koriste u pripremi bioloških uzoraka (3, 4). Posebno se ističu tehnike koje su u skladu s načelima Zelene analitičke kemije (engl. *Green Analytical Chemistry*, GAC). Klasične tehnike pripreme uzoraka kao što su ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće (eng. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) sve češće se zamjenjuju naprednim i ekološki prihvatljivim tehnikama mikroekstrakcije (5). Kao glavne prednosti ovih tehnika ističe se potreba za uzorkovanjem malog volumena, ekološka prihvatljivost te mogućnost automatizacije.

S obzirom na postignuća mikroekstrakcijskih tehnika moguće je reći da pripadaju i sadašnjosti i budućnosti pripreme bioloških uzoraka.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je prezentirati trenutna dostignuća naprednih tehnika koje se koriste u pripremi uzorka u bioanalitici.

U ovom radu bit će prikazana klasifikacija navedenih tehnika, principi izvedbe kao i osvrt na njihove prednosti i nedostatke u odnosu na standardne tehnike poput SPE i LLE.

Na kraju, kroz kritički osvrt odabranih znanstvenih radova procijenit će se njihova primjena u bioanalitici.

### **3. MATERIJALI I METODE - SUSTAVNI PREGLED SAZNAJA O TEMI**



U svrhu izrade ovog specijalističkog rada pretraživat će se relevantna znanstvena i stručna literatura u bibliografskim bazama podataka (*PubMed, Web of Science, ScienceDirect i Scopus*) primjenom sljedećih ključnih riječi: *bioanalysis, sample preparation, bioanalytical methods, bioanalytical techniques, microextraction techniques*. Isto tako će se pregledati knjige i mrežne stranice koje obrađuju navedenu problematiku.

### **3.1. Osnovna načela i klasifikacija tehnika mikroekstrakcije**

Među najčešće korištene tehnike pripreme uzorka u analitici ubrajaju se ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE) i ekstrakcija čvrstom fazom (SPE).

LLE je tehnika jednostavna za izvođenje koja ne zahtijeva složenu instrumentaciju. Međutim, za pripremu bioloških uzoraka ovom tehnikom koriste se veće količine organskih otapala što ovu tehniku čini ekološki neprihvatljivom. Nadalje, organska otapala u kojima se endobiotici i ksenobiotici ekstrahiraju često su nekompatibilna s analitičkim instrumentima. Konačno kao jedan od najvažnijih ograničenja ove tehnike je postizanje slabe selektivnosti.

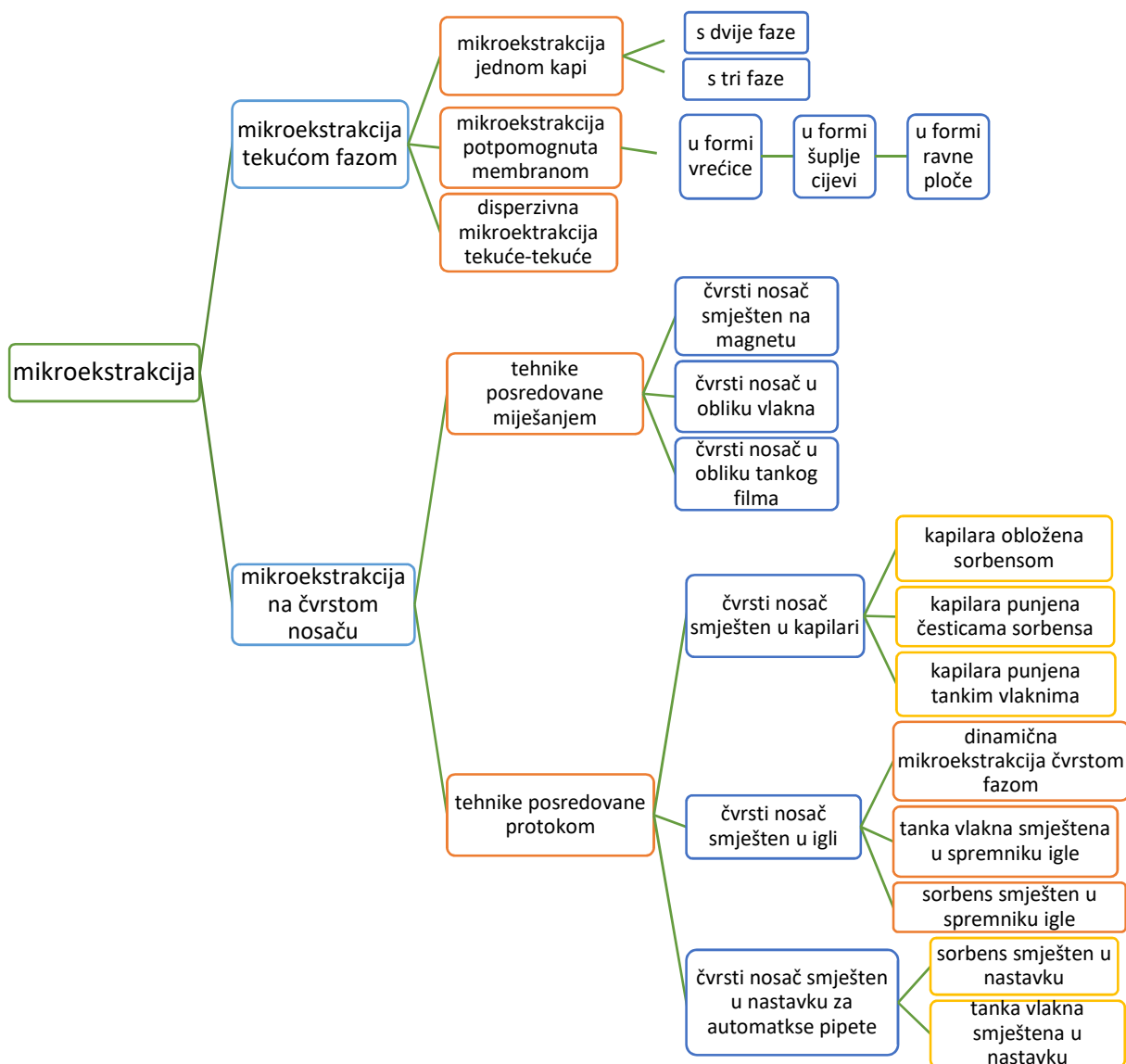
SPE u pojedinim segmentima nadilazi nedostatke LLE tehnike. Međutim, uzimajući u obzir da su biološki uzorci vrlo često dostupni u ograničenim količinama SPE tehnika se također ne čini kao najbolji izbor u pripremi uzorka u bioanalitici (6).

Razvoj mikroekstrakcijskih tehnika, kod kojih je volumen ekstrakcijske faze kao i volumen uzorka značajno manji u odnosu na gore navedene tehnike, išao je u smislu uklanjanja nedostatka gore navedenih tehnika. Cilj njihova razvoja bio je usmjeren prema razvoju tehnika koje su pouzdane, jednostavne, brze, selektivne, učinkovite, ekološki i ekonomski prihvatljive,

prikladne za automatiziranje i rutinsku primjenu, kompatibilne s različitim analitičkim tehnikama te sigurne za analitičara.

U ovom radu proučit će se različite mikroekstrakcijske tehnike kako bi se utvrdilo da li su postignuti navedenih visoki zahtjevi (7).

Na **Slici 1.** shematski su prikazane mikroekstrakcijske tehnike grupirane prema načinu provedbe ekstrakcije analita iz uzorka.



**Slika 1.** Podjela tehnika mikroekstrakcije (prilagođeno prema literaturnom navodu 8).

Mikroekstrakcijske tehnike se dijele u dvije osnovne skupine: mikroekstrakcija na čvrstom nosaču (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) i mikroekstrakcija tekućom fazom (engl. *Liquid Phase Microextraction*, LPME).

Tehnike koje pripadaju prvoj skupini dijele se na temelju dva osnovna mehanizma difuzije: tehnike mikroekstrakcije posredovane miješanjem (engl. *Stirring Mediated Solid Phase Microextraction*) ili protokom (engl. *Flow Through Mediated Solid Phase Microextraction*).

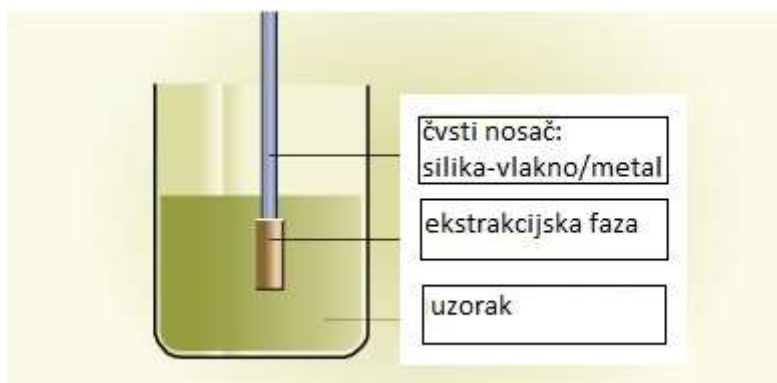
Nadalje, kod mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem čvrsti nosač može biti smješten na magnetu (engl. *Stir - Bar Sorptive Extraction, SBSE*) ili je u obliku vlakna (engl. *Fiber Solid Phase Microextraction*) odnosno tankog filma (engl. *Thin Film Solid Phase Microextraction, TFME*). Podjela tehnika posredovanih protokom također se zasniva se smještaju čvrstog nosača: u koloni (engl. *in - tube Solid Phase Microextraction, IT - SPME*), u igli (engl. *in - needle Solid Phase Microextraction*) ili u nastavku za automatske pipete (engl. *in - tip Solid Phase Microextraction*).

U drugu skupinu ubraja se mikroekstrakcija jednom kapi (engl. *Single Drop Microextraction*), mikroekstrakcija potpomognuta membranom (engl. *Membrane - assisted Microextraction*) i disperzivna mikroekstrakcija tekuće - tekuće (engl. *Dispersive Liquid - Liquid Microextraction, DLLME*). Nadalje, mikroekstrakcija jednom kapi može biti s dvije ili tri faze, dok kod mikroekstrakcije potpomognute membranom, membrana može postavljena u formi vrećice (engl. *Membrane Bag - Liquid Phase Microextraction*), ravne ploče (engl. *Flat - sheet Membrane - Liquid Phase Microextraction*) ili šuplje cijevi (engl. *Hollow-fiber - Liquid Phase Microextraction*) (8).

### **3.2. Mikroekstrakcija na čvrstom nosaču**

Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME), koju je uveo J. Pawliszyn 1987. godine, zasigurno predstavlja početak novog područja u pripremi analitičkih uzoraka povezujući uzorkovanje,

ekstrakciju i ukoncentriravanje analita u jedan korak (5). Prva izvedba tehnike temeljila se na adsorpciji analita izravno iz vodenih uzoraka na vlakno izrađeno od kvarcnog stakla presvučenog sorbentsom (7). To znači da se mala količina ekstrakcijske faze, tj. sorbensa kojim je obloženo vlakno, izlaže uzorku kroz unaprijed određeno vrijeme.



**Slika 2.** Shematski prikaz mikroekstrakcije na čvrstom nosaču (preuzeto i prilagođeno s <http://www.chromedia.org>).

Proces mikroekstrakcije se smatra dovršenim kada se postigne ravnoteža raspodjele analita između matrice uzorka i sorbensa kojim je obloženo vlakno. Uvjetu ravnoteže moguće je opisati jednačbom prema zakonu očuvanja mase, ako se uzmu u obzir samo dvije faze (npr. matrica uzorka i sorbens):

$$C_0 \times V_s = C_s^\infty \times V_s + C_f^\infty \times V_f \quad (1)$$

gdje je

$C_0$  = početna koncentracija analita u uzorku

$C_s^\infty$  = ravnotežna koncentracija analita u uzorku

$C_f^\infty$  = ravnotežna koncentracija analita u ekstrakcijskoj fazi

$V_s$  = volumen uzorka

$V_f$  = volumen ekstrakcijske faze.

Koeficijent razdiobe ( $K_{fs}$ ) analita između sorbensa i matrice uzorka može se definirati kao:

$$K_{fs} = \frac{C_f^\infty}{C_s^\infty} \quad (2)$$

Prve dvije jednadžbe mogu se kombinirati:

$$C_f^\infty = C_0 \times \frac{K_{fs} \times V_s}{K_{fs} \times V_f + V_s} \quad (3)$$

Konačno, broj molova analita ( $n$ ) koji je ekstrahiran može se izračunati iz jednadžbe:

$$n = C_f^\infty \times V_f = C_0 \times \frac{K_{fs} \times V_s \times V_f}{K_{fs} \times V_f + V_s} \quad (4)$$

Jednadžba prikazuje da je količina ekstrahiranog analita ( $n$ ) linearno proporcionalna početnoj koncentraciji analita u uzorku ( $C_0$ ).

U zadnjoj jednadžbi se pretpostavlja da je matrica uzorka jedna homogena faza, međutim ona se može modificirati kako bi se objasnilo postojanje više odjeljaka u matrici, uzimajući u obzir volumene pojedinih faza i odgovarajuće konstante razdiobe. Pored toga, kada je volumen uzorka jako velik, tj.  $V_s \gg K_{fs} \times V_f$ , jednadžbu je moguće pojednostaviti:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (5)$$

Upravo ova posljednja jednadžba upućuje na korisnost tehnike kada je volumen uzorka nepoznat. Količina ekstrahiranog analita izravno je proporcionalna njegovoj koncentraciji u matrici, bez ovisnosti o volumenu uzorka.

Nadalje, u trenutku postizanja ravnoteže količina ekstrahiranog analita je najviša što omogućava najnižu osjetljivost metode. S druge strane, ukoliko zahtjevi metode ne postavljaju iznimno nisku osjetljivost vrijeme ekstrakcije je moguće skratiti. Konačno potrebno je istaknuti kako postupak ekstrakcije najviše ovisi o konstanti razdiobe ( $K_{fs}$ ) budući da ovaj parametar opisuje selektivnost ekstrakcijske faze prema analitu u odnosu na ostale sastavnice uzorka.

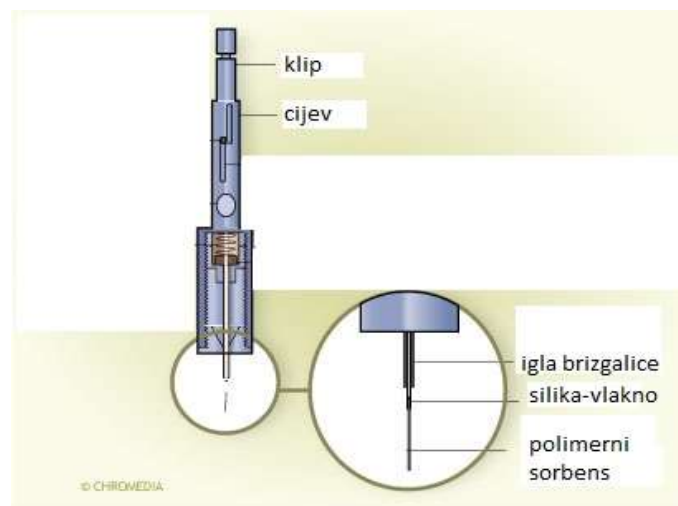
SPME tehnika je kompatibilna s većinom analitičkih instrumentalnih tehnika koji se koriste u bioanalitici što osigurava široku primjenu tehnike. Nadalje, ovakva obrada bioloških uzoraka doprinosi visokoj selektivnosti i niskoj osjetljivosti bioanalitičkih metoda (9).

### 3.2.1. Podjela mikroekstrakcija na čvrstom nosaču

Kao što je navedeno u poglavlju 3.1, tehnike mikroekstrakcije na čvrstom nosaču mogu se podijeliti u dvije osnovne skupine. Tehnike koje koriste princip difuzije potpomognute miješanjem smatraju se statičnim tehnikama, dok one koje koriste princip difuzije potpomognute protokom dinamičnim tehnikama.

#### 3.2.1.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno

Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno (*fiber SPME*) smatra se jednom od prvih razvijenih mikroekstrakcijskih tehnika. Osnovni dio pribora za mikroekstrakciju čvrstom fazom ovog tipa sastoji se od igle brizgalice unutar koje je smješteno vlakno obloženo polimernim sorbensom (**Slika 3.**).



**Slika 3.** Konfiguracija ekstrakcijskog pribora za fiber SPME tehniku (preuzeto i prilagođeno s <http://www.chromedia.org>).

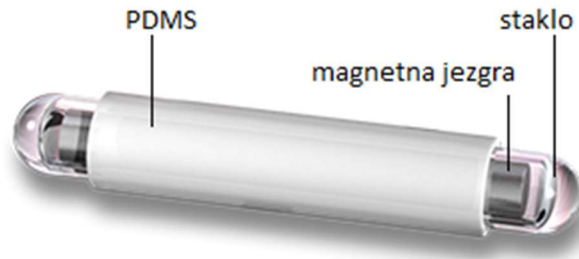
SPME vlakna s različitim polimernim sorbensima danas su komercijalno dostupna. Osim toga, nova inovativna vlakana razvijena su kako bi se postigla bolja selektivnost i duži vijek trajanja. Kod ove tehnike ekstrakcijski postupak počinje postavljanjem vlakna u uzorak te raspodjelom analita između uzorka i sorbensa kojim je presvučena vanjska površina. *Fiber* SPME tehnika se dijeli se na dva izvedbena formata s obzirom na položaj vlakna u odnosu na uzorak. Ukoliko je vlakno neposredno izloženo tekućem uzorku tada se govori o direktnoj *fiber* SPME tehnici (engl. *Direct Immersion - Solid Phase Microextraction*, DI - SPME) odnosno ukoliko se vlakno postavlja iznad tekućeg ili krutog uzorka izloženog povišenoj temperaturi tada se govori o indirektnoj *fiber* SPME tehnici (engl. *Headspace - Solid Phase Microextraction*, HS - SPME). Nakon što se postigne ravnoteža vlakno se uklanja iz uzorka te započinje s desorpcijom analita s vlakna. Desorpcija se provodi ili termalno ili prikladnim otapalom ovisno o analitičkoj tehnici koja će se koristiti za analizu uzorka. *Fiber* SPME rutinski se koristi u kombinaciji s GC odnosno GC/MS tehnikama uz termalnu desorpciju analita s vlakna. *Fiber* SPME je također moguće direktno povezati s LC odnosno LC/MS tehnikama za analizu slabo hlapljivih ili termolabilnih



spojeva koji se ne mogu analizirati GC tehnikom. U odnosu na standardne tehnike pripreme uzoraka SPE i LLE glavne prednosti ove tehnike su jednostavnost i brzina izvođenja te mogućnost automatizacije. *Fiber SPME* za razliku od prethodno navedenih tehnika objedinjuje postupak ekstrakcije u jednom koraku. Za provedbu ekstrakcije nisu potrebna ekološki neprihvatljiva organska otapala kao ni velik volumen uzorka. Tehnika osigurava visoku selektivnost i nisku osjetljivost bioanalitičke metode što ju uz gore navedene prednosti čini prikladnom za rutinske analizama u kliničkim laboratorijima (7, 10).

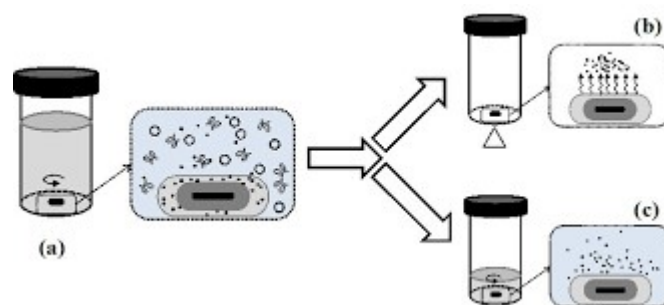
#### 3.2.1.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na magnet

Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na magnet ili adsorpcijska ekstrakcija magnetom (SBSE) je tehnika pripreme uzoraka koju je razvio Pat Sandra i njegova istraživačka grupa s ciljem povećanja ekstrakcijske učinkovitosti SPME (11). Kod ove tehnike čvrsti nosač polidimetilsiloksan (PDMS) postavljen je na staklenu cijev u kojoj se nalazi magnet u debljini od 0,3 do 1,0 mm (**Slika 4.**). Ekstrakcija analita upravljana je njegovim koeficijentom razdiobe između PDMS-a i uzorka. Osim navedenog sorbensa koriste se i različiti polimerni materijali. Međutim, potrebno je posebno istaknuti i nove inovativne sorbense: polidimetilsiloksan/etilenglikol kopolimer smješten na inertnoj metalnoj mreži radi mehaničke stabilizacije te PDMS koji u dodiru s otapalom bubri (engl. *Solvent - Assisted Stir Bar Sorptive Extraction, SA - SBSE*).



**Slika 4.** Prikaz čvrstog nosača polidimetilsiloksana postavljenog na staklenu cijevi u kojoj se nalazi magnet (preuzeto i prilagođeno s <http://www.gerstel.com>).

Postupak ekstrakcije se provodi na način da se čvrsti nosač postavi direktno u uzorak koji se potom miješa primjenom magnetske miješalice (engl. *Direct Immersion - Stir-Bar Sorptive Extraction*, DI - SBSE). Ukoliko se čvrsti nosač postavi iznad tekućeg ili krutog uzorka izloženog povišenoj temperaturi tada se govori o indirektnoj SBSE tehnici (engl. *Headspace - Stir-Bar Sorptive Extraction*, HS - SBSE). Nakon postizanja ravnoteže čvrsti nosač se ukloni iz uzoraka te ispere prikladnim otapalom. Desorpcija analita se provodi termički ili otapalima nakon čega se uzorci analiziraju GC odnosno LC tehnikama (**Slika 5**).



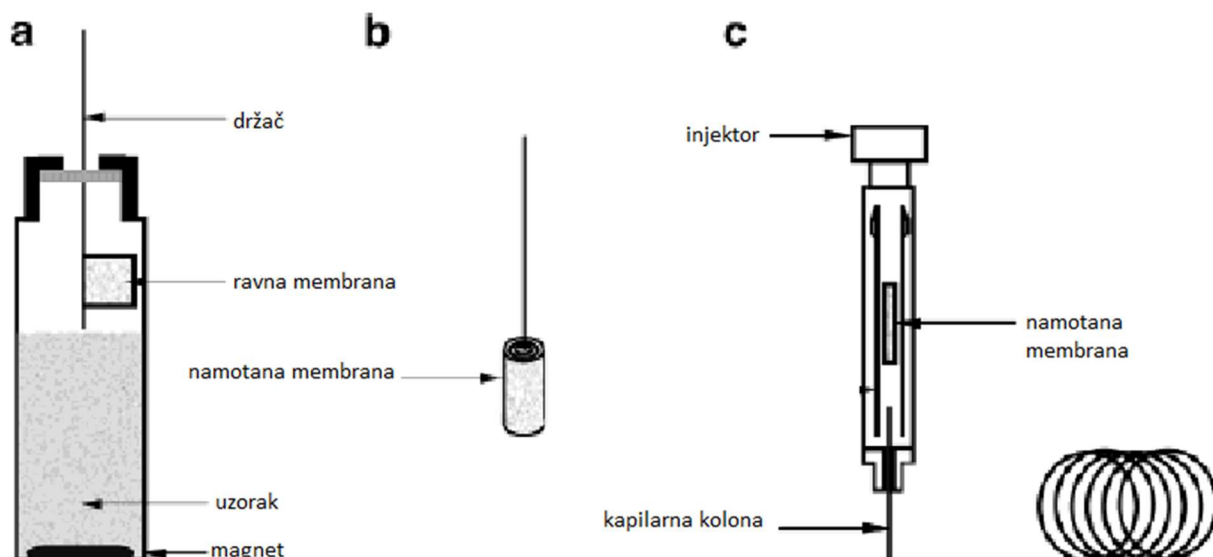
**Slika 5.** Postupak ekstrakcije čvrstom fazom primjenom DI - SBSE tehnike: (a) ekstrakcija analita na sorbens, (b) termalna desorpcija analita te (c) desorpcija analita prikladnim otapalom (preuzeto s <http://www.intechopen.com>).

S obzirom na gore navedeno moguće je zaključiti kako SBSE tehnika u odnosu na SPE i LLE tehnike iznimno jednostavna za izvođenje. Prema literaturnim podacima moguće je utvrditi kako se ovom tehnikom postiže i do 1000 puta niža osjetljivost metode uz široki linearni raspon i ponovljivost ekstrakcijskog postupka. Nadalje, kada se uspoređi *fiber* SPME tehnika s SBSE tehnikom potrebno je naglasiti kako sloj nanesenog sorbensa na magnet je i do 250 puta deblji od nosača kod *fiber* SPME tehnike. Upravo radi toga bioanalitičke metode koje koriste za pripremu uzorka SBSE tehniku dosežu iznimno niske vrijednosti limita detekcije (engl. *Limit of Detection*, LOD) i određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ). Osjetljivost na razini nižoj od ng/L postiže se primjenom inovativnog sorbensa PDMS-a koji u dodiru s otapalom bubri. Njegovim bubrenjem postiže se veći volumen ekstrakcijskog sredstava te time i veća ekstrakcijska učinkovitost. Upravo ovaj sorbens namijenjen je ekstrakciji polarnih analita čije su log  $K_{ow}$  vrijednosti niže od 2. Kada se govori o razvoju, izvedbenim karakteristikama i prednostima ove tehnike potrebno je istaknuti i mogućnost korištenja istovremeno ili uzastopno nekoliko različitih nosača (engl. *Multi - Stir Bar Sorptive Extraction*, <sup>m</sup>SBSE) u svrhu postizanja visoke selektivnosti metode. Prilikom istovremenog korištenja više nosača isti se smještaju uz unutarnju stijenku laboratorijske posude primjenom magnetnog obruča.

Selektivnost metode moguće je poboljšati i primjenom magneta na koji se nalaze dva različita sorbensa. Najčešće se kombiniraju sorbensi na bazi ugljika i PDMS. Najveći nedostatak ove tehnike u odnosu na *fiber* SPME je da se ne može u potpunosti automatizirati postupak pripreme uzorka (4, 10).

#### 3.2.1.3. Mikroekstrakcija tankim filmom

Mikroekstrakcija tankim filmom (TFME) razvijena je kako bi se povećala osjetljivost bioanalitičkih metoda. Naime, uočeno je kako PDMS u obliku tankog filma odnosno membrane velike površine ima značajno veću ekstrakcijsku učinkovitost u odnosu na druge formate poput vlakna i cjevčica. Ovakvom izvedbom ekstrahira se veća količina analita iz uzorka u kraćem vremenu budući da ekstrakcijsko sredstvo ima visoki omjer površine i volumena. Postupak se izvodi na način da se membrana uspravno pričvrsti na držač i kao takva postavi u uzorak. Nakon ekstrakcije namota se oko držača i uvodi u GC instrument gdje se pod povišenom temperaturom desorbiraju ekstrahirani analiti (**Slika 6.**). Ovakav pristup je prikladan za ekstrakciju hidrofobnih poluhlapljivih analita s visokim konstantama razdiobe (7, 12).



**Slika 6.** Postupak ekstrakcije čvrstom fazom primjenom TFME tehnike (prilagođeno prema literaturnom navodu 11).

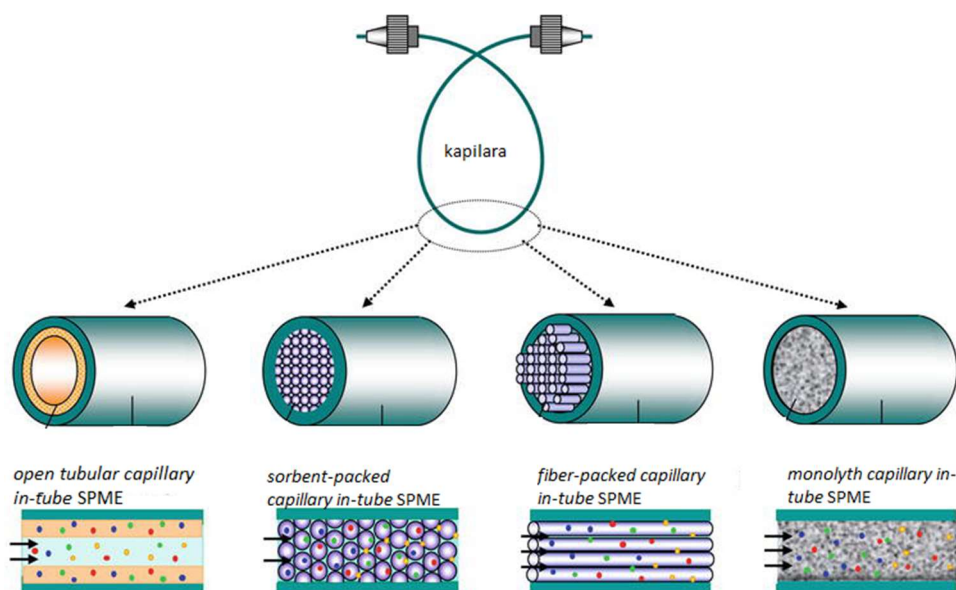
#### 3.2.1.4. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari

Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari (*in - tube* SPME) spada u mikroekstrakcije tehnike kod kojih je ekstrakcija analita posredovana protokom. Kod ove tehnike sorbens je smješten unutar kapilare što omogućava *on - line* povezivanje koraka pripreme uzorka s analitičkim instrumentom. Kod standardnih *in - tube* SPME unutarnja stijenka otvorene kapilare od razvučenog kvarca obložena je sorbensom (engl. *open tubular capillary*) te kroz nju prolazi svega nekoliko mikrolitara uzorka. Analit se iz uzorka ekstrahira na sorbens na temelju koeficijenta raspodjele. Koncentracija adsorbiranog analita je proporcionalna njegovoj koncentraciji u uzorku te za pouzdanu kvantitativnu analizu nije potrebno postizanje stanja ravnoteže premda se najniža osjetljivost metode postiže upravo u stanju ravnoteže. Osim standardnih *in - tube* SPME kolona dostupne su i kolone kod kojih je kapilara punjena česticama sorbensa (engl. *sorbent - packed capillary*, IT - SPME), tankim vlaknima kao sorbensom (engl. *fiber - packed capillary*, IT - SPME) te monolitnim sorbensom (engl. *monolith*

*capillary*, IT - SPME). U navedenim izvedbama IT - SPME tehnike analiti se apsorbiraju ili adsorbiraju na sorbens. Različite vrste sorbensa se koriste u IT - SPME tehnici: od standardnih nepokretnih faza koje se koriste kod GC kolona do inovativnih sorbensa poput materijala ograničenog pristupa, polimera s molekulskim otiskom, kristaliničnih poroznih hibridnih organskih - anorganskih supramolekularnih materijala (engl. *Metal - Organic Frameworks*, MOFs),  $\beta$  - ciklodekstrina, polipirola i magnetskih nanočestica  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  (13) (**Slika 7.**).

Ono što je potrebno naglasiti je da za povezivanje IT - SPME tehnike s HPLC tehnikom potrebna je nadogradnja standardne HPLC instrumentacije. Ovakvi sustavi zahtijevaju uporabu dviju pumpi te jednog do dva ventila sa šest otvora.

Kao glavna prednost IT - SPME tehnike, kao što je već rečeno, je mogućnost povezivanja SPME i HPLC tehnike, čime je omogućen neprekidni proces pripreme i analize uzoraka. Automatizirani postupci rukovanja s uzorcima ne samo da skraćuju cjelokupno vrijeme analize, nego su točniji i precizniji od manualnih tehnika. U odnosu na standardne SPE i LLE tehnike, IT - SPME tehnika omogućava smanjenje potrošnje kao i izlaganja analitičara organskim otapalima (7, 14).



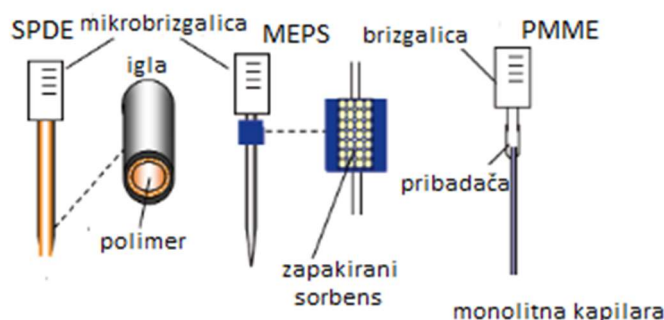
**Slika 7.** Prikaz kapilara koje se koriste kod IT - SPME tehnike (preuzeto i prilagođeno s <http://www.intechopen.com>).

### 3.2.1.5. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u igli

Mikroekstrakcija čvrstom fazom s sorbentsom smještenim u igli (*in - needle SPME*) također spada u mikroekstrakcije tehnike kod kojih je ekstrakcija analita posredovana protokom. Ove tehnike se dijele na temelju položaja sorbensa (**Slika 8**). Naime, unutarnja stijenka igle može biti obložena sorbentsom i tada se govori o dinamičnoj mikroekstrakciji čvrstom fazom sa sorbentsom smještenim u igli (engl. *Solid - Phase Dynamic Extraction*, SPDE). Kod SPDE tehnike analiti se iz uzorka ekstrahiraju na filmu od PDMS-a i 10 %-tnog aktivnog ugljena kojim je obložena unutrašnja površina igle od nehrđajućeg čelika. Na isti način se može provesti i uzorkovanje lako hlapljivih analita iznad tekućih i krutih uzoraka (engl. *headspace*). Nakon ekstrakcije analiti provodi se njihova termalna desorpcija direktno u injektoru GC instrumenta. Nadalje, sorbens može biti smješten u spremniku igle (engl. *Microextraction by Packed Sorbent*, MEPS). Sorbensi koji se koriste u ovoj tehnici uključuju materijale: obrnutih

faza (C2, C8 i C18), normalnih faza (silikagel), ograničenog pristupa (engl. *Restricted Access Material*, RAM) i polimere s molekulskim otiskom (engl. *Molecular Imprinted Polymers*, MIP). Polimerni monolitni materijali, separacijski medij koji se zbog visoke učinkovitosti često koristi kao nepokretna faza u kromatografskim tehnikama, se također mogu postaviti u iglu brizgalice (engl. *Polymer Monolith Microextraction*, PMME). Velika površina poroznog polimernog monolitnog materijala omogućava visoku ekstrakcijsku učinkovitost. Nakon obrade uzoraka tehnikama MEPS i PMME vrlo često se provodi analiza LC i GC tehnikama. Štoviše, sve tri *in-needle* SPME tehnike pripreme uzoraka mogu se *on-line* povezati s kromatografskim instrumentima što uz komercijalnu dostupnost velikog broja sorbensa omogućava primjenu ovih tehnika u rutinskim analizama u kliničkim laboratorijima.

U odnosu na standardnu SPE tehniku vrijeme pripreme uzorka kao i volumen uzorka i organskih otapala znatno su smanjeni što ove tehnike zasigurno uvrštava među zelene tehnike pripreme uzoraka. Nadalje, MEPS sorbens se može koristiti i do 100 puta (7, 15).



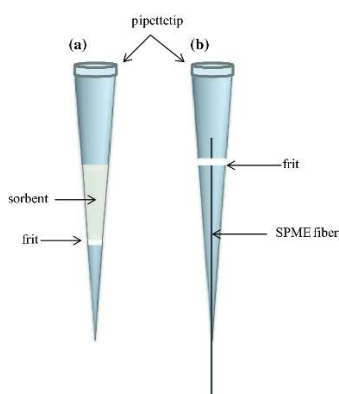
**Slika 8.** Postupak ekstrakcije čvrstom fazom primjenom *in-needle* SPME tehnika

(prilagođeno prema literaturnom navodu 7).



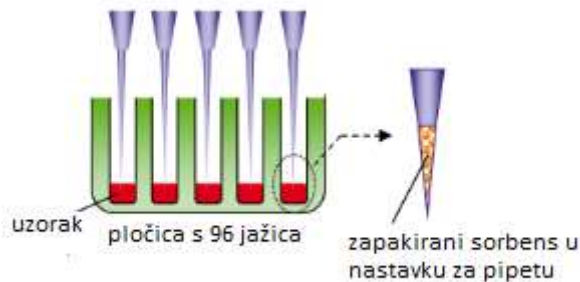
### 3.2.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete

Kod *in - tip* SPME tehnike sorbens je smješten u nastavku za automatske pipete. Sorbens može biti postavljen između dva diska odnosno njime može biti obloženo vlakno (duljine oko 1 cm) (Slika 9.). Kao sorbens koristi se modificirani silikagel, metakrilatni monoliti i ionsko izmjenjivačke smole. Količina sorbensa koja se stavlja u nastavak za pipete je od 0,2 do 0,6  $\mu\text{L}$ . Ukoliko se analiziraju teško dostupni uzorci (volumena manjeg od 1  $\mu\text{L}$ ) tada se koriste sorbensi od 0,2  $\mu\text{L}$ . Bez obzira što se ova tehnika ne može povezati *on - line* s naprednim separacijskim tehnikama njena velika prednost je mogućnost istovremene pripreme većeg broja uzorka (čak do 96 uzoraka) te mogućnost automatizacije postupka pripreme uzorka (Slika 10.) (2, 15).



**Slika 9.** *in-tip* SPME tehnika s zapakiranim sorbentsom (a) i vlaknom s obloženim sorbentsom

(b) (prilagođeno prema literaturnom navodu 16).



**Slika 10.** Prikaz automatizirane *in-tip* SPME tehnike (prilagođeno prema literaturnom navodu 7).

### 3.3. Mikroekstrakcija tekućom fazom

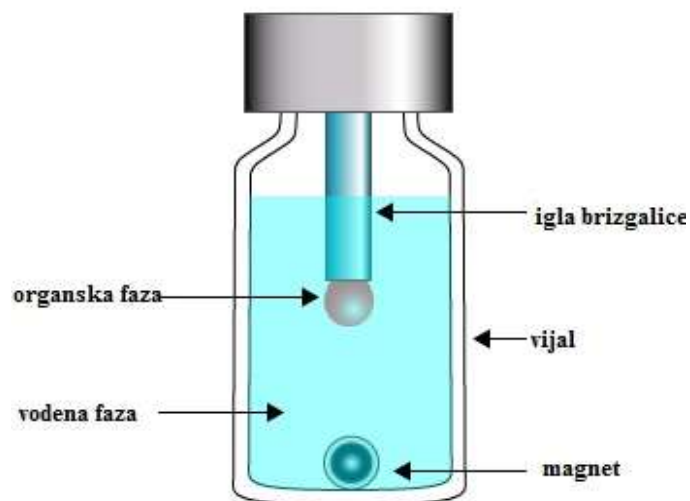
Razvoj LPME tehnike iz LLE je išao u smjeru smanjenja volumena uzorka te ekstrakcijskih otapala. Tako se kod većine ovih tehnika koristi svega nekoliko mikrolitara organskog otapala kako bi se ekstrahirao i ukoncentrirao analit. Kod ove tehnike analit se raspodjeljuje između dviju faza koje se međusobno ne miješaju s obzirom na njegovu relativnu topljivost u pojedinoj fazi. Dakle, mala količina organskog otapala predstavlja akceptorsku fazu, dok vodeni uzorak koji sadrži analit čini donorsku fazu. LPME je kompatibilna sa separacijskim tehnikama poput GC, HPLC i CE (17).

#### 3.3.1 Podjela mikroekstrakcija tekućom fazom

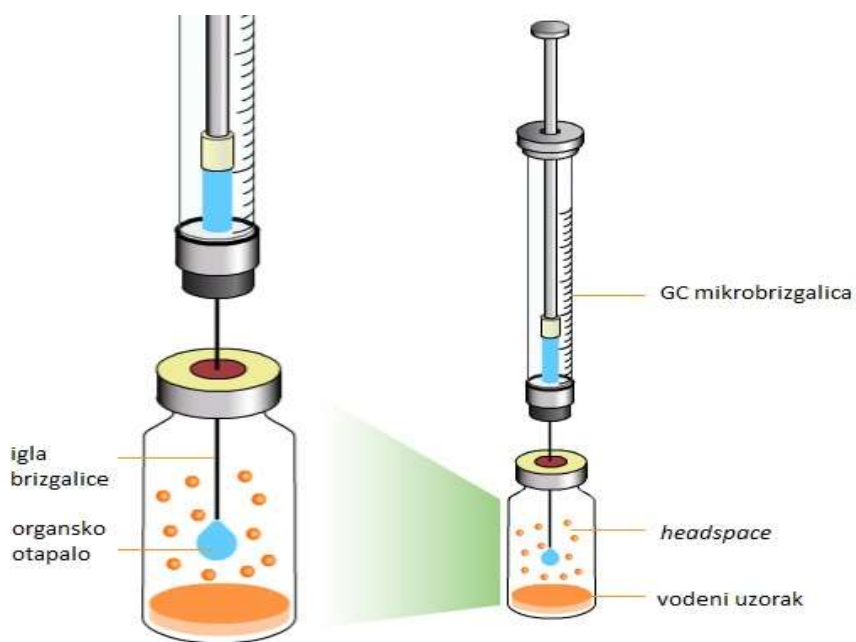
Kao što je navedeno u poglavlju 3.1, tehnike mikroekstrakcije tekućom mogu se podijeliti u tri osnovne skupine ovisno o smještaju tekuće faze.

### 3.3.1.1 Mikroekstrakcija jednom kapi

Mikroekstrakcija jednom kapi (SDME) je tehnika u kojoj se za ekstrakciju analita iz uzorka koristi jedna kap organskog otapala smještenog na vrhu igle mikrobrizgalice. Nakon ekstrakcije mikrokap se uvlači nazad u iglu i prenosi u analitički instrument. U usporedbi s tradicionalnom LLE, upotreba organskih otapala smanjena je za 99 %. Također nema potrebe za otparavanjem organskog otapala i rekonstituiranjem analita prije analize uzoraka. Međutim, glavni nedostatak SDME je slaba ponovljivost ekstrakcijskog postupka što se povezuje s nestabilnosti kapi. Kod optimizacije postupka ekstrakcije ključni parametar je odabir organskog otapala. Naime, lako hlapljiva otapala nisu prikladna za ekstrakciju dok ona s visokom točkom vrelišta imaju ograničenu primjenu. Organska otapala koja se najčešće koriste u SDME su  $n$  - oktan, izoamilni alkohol, undekan, oktan, nonan i etilenglikol. Dva su glavna pristupa pri izvođenju SDME. Kap organskog otapala s vrha mikrobrizgalice moguće je direktno uroniti u vodeni uzorak (engl. *Direct Immersion - Single Drop Microextraction*, DI - SDME) (**Slika 11.**) odnosno u prostor iznad tekućeg ili krutog uzorka (engl. *Headspace – Single Drop Microextraction*, HS - SDME) (**Slika 12.**).



**Slika 10.** DI - SDME tehnika (preuzeto i prilagođeno s <http://www.chromacademy.com>).



**Slika 11.** HS - SDME tehnika (preuzeto i prilagođeno s <http://www.chromacademy.com>).

Primjena DI - SDME tehnike je ograničena na nepolarne i srednje polarne analite te na organska otapala koja se ne miješaju s vodom. HS - SDME ima slične mogućnosti u pogledu preciznosti i brzine analize kao DI - SDME, ali ima prednost šireg izbora otapala. Za razliku od DI - SDME, voda je moguće koristiti i kao otapalo kod HS - SDME za ekstrakciju analita koji su

hlapljivi i topljivi u vodi. To značajno povećava spektar analita koji se mogu ekstrahirati ovim postupkom kao i tehnika kojima se nakon ekstrakcije uzorci mogu analizirati. Nadalje, HS - SDME je prikladna za ekstrakciju analita iz složenih matrica. Većinom se SDME provodi s dvije faze, odnosno analiti se ekstrahiraju iz vodene u organsku fazu. Međutim, isto tako je moguće izvesti ekstrakciju s tri faze, gdje se analiti prvo ekstrahiraju iz vodene u organsku fazu, a zatim ponovno u vodenu (10, 17).

### 3.3.1.2 Membranom potpomognuta mikroekstrakcija

Membranom potpomognuta mikroekstrakcija se zasniva na upotrebi polimerne membrane čija svrha je uklanjanje nedostatka (posebice nestabilnosti kapi) SDME tehnike. Ova ekstrakcijska tehnika se dijeli u dvije osnovne skupine na temelju svojstava membrane: tehnike koje koriste poroznu odnosno neporoznu membranu. Kod prve skupine pore membrane su natopljene ekstrakcijskom organskom fazom te kroz pore analit difundira iz donorske u akceptorsku fazu. Sama membrana nema ulogu u ekstrakciji analita već samo pruža podršku ekstrakcijskoj fazi. Membrana može imati oblik kratkog šupljeg vlakna ili cijevi (engl. *Hollow Fiber – Liquid Phase Microextraction*, HF - LPME), ravne ploče (engl. *Flat - sheet Membrane - Liquid Phase Microextraction*), odnosno može biti u formi vrećice (engl. *Membrane Bag - Liquid Phase Microextraction*). Tehnike koje koriste neporoznu polimernu membranu su u odnosu na one koje koriste porozne selektivnije, budući da je ekstrakcija analita ovakvom membranom složeni proces.

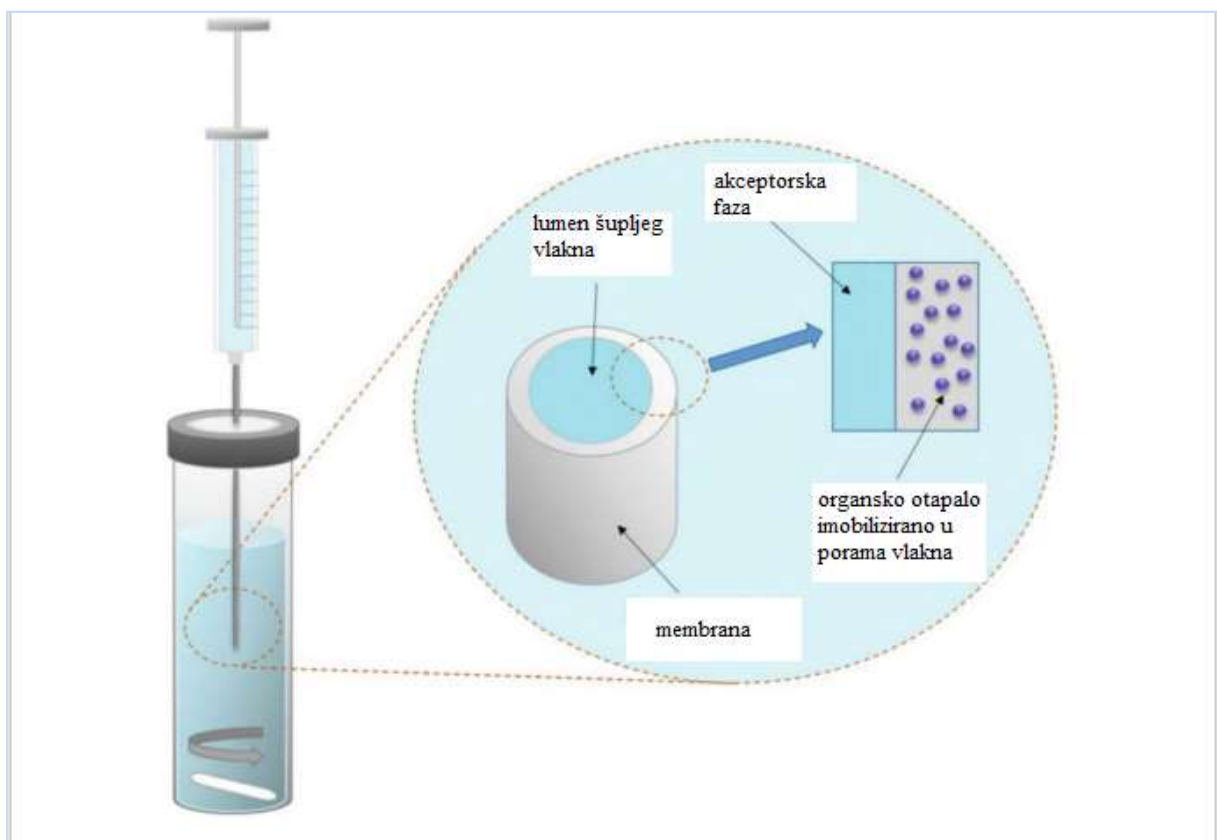
Među navedenim tehnikama HF - LPME tehnika je zasigurno najzastupljenija. Njena glavna značajka je uporaba hidrofobne porozne polimerne membrane koje služe kao potpora akceptorskoj fazi, ali i kao fizička barijera između dviju faza. Prema tome ekstrakcijsko sredstvo

nije u neposrednom kontaktu s uzorkom. Membrana je obično izrađena od polipropilena ili drugih poroznih hidrofobnih materijala. Polipropilen je visoko kompatibilan sa širokim spektrom organskih otapala koja se imobiliziraju u porama, rastezljiv je i mehanički čvrst te ne adsorbira na sebe analite. Kako bi molekule organskog otapala čvrsto zadržala u porama, a istovremeno bi pore ostale otvorene za analite optimalno je da vlakno ima unutarnji promjer 600  $\mu\text{m}$ , debljinu stjenke 200  $\mu\text{m}$ , 0,2  $\mu\text{m}$  veličinu pora te 70 % poroznosti. Pri ovim uvjetima dodirna površina između otapala i vodene faze je dovoljno velika da se osigura visoka ekstrakcijska učinkovitost. Otapala koja se imobiliziraju u porama moraju ispuniti nekoliko kriterija. Bitno je istaknuti kako se otapalo ne smije miješati s vodom kako bi se osiguralo da ostane u porama za vrijeme trajanja ekstrakcije te da se na površini membrane formira tanki film. Nadalje, ne smije biti lako hlapljivo te treba lako otopiti analit. Primjerice, za ekstrakciju nepolarnih analita priklada su organska otapala *n* - oktanol i toluen. Dakle, prije ekstrakcije membrana u obliku šupljeg vlakna se najprije umoči nekoliko puta u organsko otapalo kako bi se ono imobiliziralo u njenim porama, a višak otapala se potom ukloni. Ekstrakcija je moguće provoditi kroz dvije (isto otapalo ispunjava i pore i unutrašnjost vlakna), odnosno tri faze (organsko otapalo ispunjava pore dok je unutrašnjost vlakna ispunjena kiselom ili bazičnom vodenom otopinom).

Glavne prednosti HF - LPME uključuju nisku potrošnju organskih otapala, stabilnost ekstrakcijske faze (što je jako teško postići kod SDME) i mogućnost uklanjanja molekula velike mase koje ne mogu proći membransku barijeru. Niska cijena pripreme uzoraka omogućava upotrebu novog vlakna za svaki uzorak što sprječava unakrsnu kontaminaciju uzoraka (engl. *carry - over*). Također, ova robusna tehnika pripreme uzoraka je kompatibilna s velikim brojem analitičkih instrumenata. Dok se kod dvofazne ekstrakcije ekstrahirani uzorci mogu

neposredno analizirati GC tehnikom, za analizu s HPLC i CE tehnikama potreban je dodatan korak uklanjanja organskih otapala te rekonstruiranja uzorka u vodenom mediju.

Osim u obliku šupljeg vlakna mogu se koristiti i membranske vreće (engl. *membrane bags*), koje se koriste jednokratno kako bi se izbjegao problem unakrsne kontaminacije, te ravna membrana (engl. *flat-sheet*) koja se također može više puta upotrijebiti i prikladnija je za veće volumene uzorka koji su prisutni u ovakvom tipu ekstrakcije (10, 17, 18, 19).

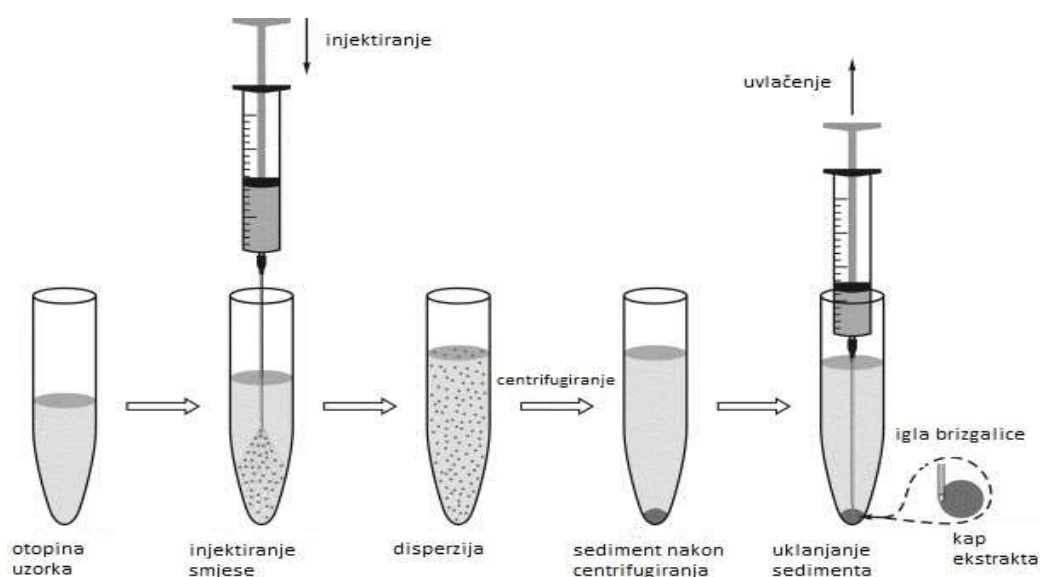


**Slika 12.** Prikaz HF - LPME tehnike (prilagođeno prema literaturnom navodu 18).

### 3.3.1.3 Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće

Kod disperzivne mikroekstrakcije tekuće-tekuće (DLLME) ekstrakcijsko otapalo koje se ne miješa s vodom se dodaje u disperzivno otapalo koje se miješa s vodom te se potom smjesa brzo

doda u vodeni uzorak. Miješanjem nastane mutna otopina koja se sastoji od mikrokapi ekstrakcijskog otapala dispergiranog u vodenom uzorku (**Slika 13**). Na ovaj način omogućena je trenutna raspodjela analita iz vodene faze u ekstrakcijsku budući da je postignuta velika površina ekstrakcijske faze. Uzorak se zatim centrifugira čime se emulzija razbije u dvofazni sustav, a donji sloj koji sadržava ekstrahirane analite se uzima za daljnju analizu. U ovoj tehnici disperzivno otapalo igra ključnu ulogu jer pomaže stvaranju sitnih kapljica ekstrakcijskog otapala u uzorku. Zbog niske toksičnosti i cijene, aceton, metanol, etanol i acetonitril se uglavnom koriste kao disperzivna otapala. Glavne prednosti DLLME su jednostavnost i brzina izvođenja, niska cijena te visoka ekstrakcijska učinkovitost (17, 20).



**Slika 13.** Prikaz DLLME tehnike (prilagođeno prema literaturnom navodu 20).



## 4. RASPRAVA

#### 4.1. Odabrani primjeri tehnika mikroekstrakcije na čvrstom nosaču

##### 4.1.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno

Kao što je navedeno u poglavlju 3.2.1.1, mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno (*fiber* SPME) smatra se jednom od prvih razvijenih tehnika mikroekstrakcije. Danas su komercijalno dostupna SPME vlakna s različitim polimernim sorbensima te stoga ne čudi široka primjena ove tehnike u bioanalitici.

Svojstva sorbensa s kojim je obloženo SPME vlakno je jedan od najvažnijih čimbenika koji utječe na učinkovitost *fiber* SPME tehnike. Najčešće korištene vrste sorbensa u SPE, pa tako i u SPME tehnici su modificirani silikagel, polimeri i materijali na bazi ugljika. Međutim, zbog nekih ograničenja, kao što su fizička i kemijska nestabilnost pri niskim ili visokim pH vrijednostima, nizak kapacitet i ograničena ponovna upotreba ovih konvencionalnih sorbensa, posljednjih nekoliko godina provedeno je mnoštvo istraživanja kako bi se razvila inovativna vlakna s ciljem povećanja učinkovitosti *fiber* SPME postupka (21). U **Tablici 1.** obuhvaćene su bioanalitičke metode u kojima je za pripremu uzoraka korištena *fiber* SPME tehnika. Iz tablice je vidljivo da su ekstrakcijske učinkovitosti metoda, prikazane kao prinosi, bile veće od 60 %.

**Tablica 1.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena *fiber* SPME tehnika u pripremi uzoraka.

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon (mg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Plazma	Amoksicilin	PMeth/MIP <sup>a</sup>	LC-MS/MS	1-50	0,130	65	22
Plazma	Cefataksim	PTh/MIP <sup>b</sup>	LC-MS/MS	1-50	0,138	> 70	22
Plazma	Ciprofloksacin	PPy/MIP <sup>c</sup>	LC-MS/MS	1-50	0,145	80	22
Plazma	Daptomicin	PPy/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,129	> 70	22
Plazma	Flukonazol	PTh/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,142	65	22
Plazma	Gentamicin	PMeth/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,157	> 65	22
Plazma	Klindamicin	PPy/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,145	> 65	22
Plazma	Lineazolid	PPy/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,198	85	22
Plazma	Metronidazol	PTh/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,126	> 65	22
Plazma	Moksifloksacin	PMeth/MIP	LC-MS/MS	1-50	0,139	> 70	22
Plazma	Bromazepam	RAMIP	HPLC-DAD	0,05-0,75	20,0	-	23
Plazma	Klonazepam	RAMIP	HPLC-DAD	0,015-0,250	5,0	-	23
Plazma	Alprazolam	RAMIP	HPLC-DAD	0,015-0,350	5,0	-	23

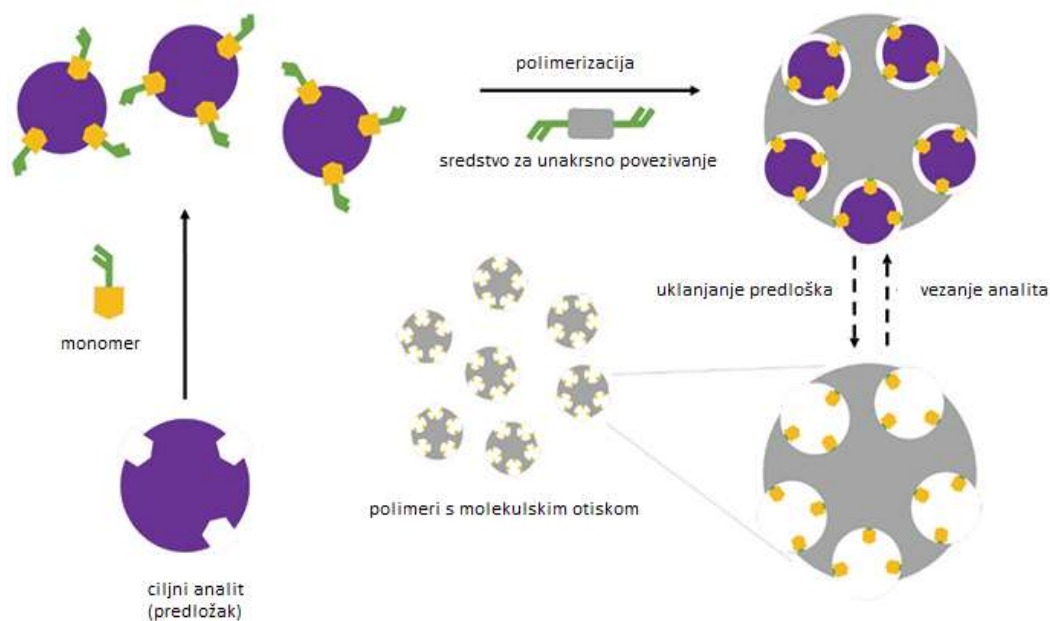
Uzorak	Analit	Sorbens	Analički instrument	Linearni raspon (mg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Plazma	Nordiazepam	RAMIP	HPLC-DAD	0,1-2,1	30,0	-	23
Plazma	Diazepam	RAMIP	HPLC-DAD	0,1-2,6	30,0	-	23

<sup>a</sup> PMeth/MIP – poli-3-metiltiofen

<sup>b</sup> PTh/MIP – politifen

<sup>c</sup> PPy/MIP - polipirol

Polimeri s molekulskim otiskom (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) vrsta su sintetičkih sorbensa koji su privlačni mnogim znanstvenicima zbog jedinstvenih svojstava poput kemijske odnosno mehaničke stabilnosti, toplinske čvrstoće, velike selektivnosti i višekratne upotrebe. Obično se njihova trodimenzionalna struktura stvara reakcijom molekule predloška i odgovarajućeg monomera u prisutnosti sredstva za unakrsno povezivanje kako bi nastale „šupljine“ za selektivno prepoznavanje otisnute molekule nakon procesa polimerizacije (**Slika 14.**) (21).



**Slika 14.** Shematski prikaz postupka sinteze polimera s molekulskim otiskom (preuzeto i prilagođeno s <http://www.chromatographyonline.com>).

Navedeni sorbens često se koristi u *fiber* SPME tehnici. Tako su polimeri s molekulskim otiskom sintetizirani za ekstrakciju i istovremeno određivanje antimikrobnih lijekova koji su se pokazali iznimno učinkoviti u liječenju meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus*-a (MRSA) u punoj krvi pacijenata. Praćenje koncentracije lijeka tijekom terapije je postupak određivanja njegove koncentracije ili njegovog metabolita u krvi pacijenta na temelju koje se pristupa individualiziranom doziranju (doza, učestalost primjene, ljevakoviti oblik i način primjene). Individualizirano doziranje osigurava najvišu učinkovitost primijenjene terapije i svodi pojavnost toksičnog učinka na najmanju moguću mjeru. Antibiotici su skupina antimikrobnih lijekova koji spadaju među najčešće propisivane lijekove u suvremenoj medicini. Međutim, antimikrobna rezistencija je jedan od vodećih problema današnjice. Zbog otpornosti bakterija na antibiotike posebna pažnja bi se trebala pridavati njihovom nepotrebnom propisivanju. U

radu Szultke i suradnika (22) za sintezu MIP-a korištene su tri vrste polimera (polipirol, politiofen i poli-3-metiltiofen). Nakon pripreme sorbensa njime su obložena SPME vlakna, a uzorci su se potom analizirali pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije i tandemске masene spektrometrije (engl. *Liquid chromatography – tandem mass spectrometry*, LC–MS/MS). Istraživanje je obuhvatilo i ispitivanja ekstrakcijske učinkovitosti u ovisnosti o vremenu desorpcije analita s polimera u rasponu od dvije do deset minuta. Najviše analita se ekstrahiralo nakon pet minuta, što potvrđuje praktičnost analitičkog postupka. Analizirani antimikrobni lijekovi podijeljeni su u tri skupine s obzirom na različitu selektivnost prema SPME sorbensima. Upotrebom poli–3–metiltiofena postigla se najveća ekstrakcijska učinkovitost za amoksisilin, gentamicin i moksifloksacin, politiofena za cefataksim, flukonazol i metronidazol te polipirola za ciprofloksacina, klindamicina, daptomicina i linezolida. Navedeni rezultati prikazani su u **Tablici 1**. Zbog zadovoljavajuće preciznosti i točnosti metode kao i niske osjetljivosti moguće ju je uspješno primjenjivati za analizu uzoraka pacijenata s klinički dijagnosticiranom bakterijskom infekcijom.

Međutim, *fiber* SPME pokazuje jednake nedostatke kao i druge tehnike pripreme bioloških uzorka. Kao i kod konvencionalnih sorbensa makromolekule se adsorbiraju na sorbens te zauzimaju vezna mjesta analita što utječe na točnost i preciznost metode.

Tako su 2019. godine polimeri s molekulskim otiskom s ograničenim pristupim (engl. *Restricted Access Molecular Imprinted Polymers*, RAMIP) primijenjeni kao sorbens u *fiber* SPME tehnici pripreme uzoraka za ekstrakciju benzodiazepina iz bioloških tekućina (23). RAMIP su hibridni materijali koji sadrže selektivno mjesto za vezanje predloška (ili sličnog analita) i vanjski hidrofilni sloj kojim se izbjegava vezanje proteina što ih čini prikladnima za pripremu bioloških uzoraka. U ovom su se radu kao molekula predložak i monomer koristili

diazepam i metakrilna kiselina, a MIP vlakna su potom obložena s unakrsno povezanim goveđim serumskim albuminom (engl. *Bovine Serum Albumin*, BSA) koji je služio kao zaštitna barijera vezanju proteina iz uzoraka krvne plazme. RAMIP vlakna su se pokazala selektivna za benzodiazepine, a kapacitet isključenja proteina je pokazivao vrijednost od čak 98 %. Ova tehnika pripreme bioloških uzoraka zajedno sa sustavom tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (engl. *High - Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*, HPLC–DAD) pokazala se vrlo korisnom i jednostavnom metodom za određivanje često korištenih benzodiazepina u njihovom terapijskom rasponu.

Iz navedenih primjera vidljivo je da je za praćenje koncentracije lijeka tijekom terapije, ključnog koraka u individualizaciji terapije, nužan razvoj specifičnih i osjetljivih analitičkih metoda za određivanje koncentracije lijekova i njihovih metabolita u biološkim tekućinama.

Budućnost medicine se sve više usmjerava prema liječenju prilagođenom svakom pojedinom pacijentu. Zajedno s genomikom i proteomikom, metabolomika je novo područje istraživanja koje može dati uvid metaboličko stanje ukupnih biokemijskih događaja povezanih sa stanicom ili biološkim sustavom i važna je za pronalaženje novih lijekova i dijagnostičkih alata koji se sve više primjenjuju u personaliziranoj medicini. Unatoč uskom popisu metabolomičkih istraživanja, već je dokazana primjenjivost *fiber* SPME tehnike na različite složene matrice (**Tablica 2.**). Za razliku od ostalih ispitivanja u bioanalitici, cilj metabolomičkih studija je otkrivanje što većeg broja spojeva i stoga je poželjno pronaći prikladan sorbens za pripremu takvih uzoraka (24).

**Tablica 2.** Primjeri metabolomičkih ispitivanja u kojima je korištena *fiber* SPME tehnika pripreme uzoraka

Uzorak	Analit	Sorbens	Analički instrument	Literaturni navod
Plazma	Lizofosfolipidi, tigliceridi, medijatori agregacije trombocita, metaboliti linolne kiseline	MM <sup>a</sup> 45 μm	LC-MS; DI <sup>b</sup>	25
Slina	Aminokiseline, fosfogliceridi, eikozanoidi, masne kiseline	MM 45 μm C18 45 μm	LC-MS; DI	26
Urin	Lako hlapljivi metaboliti urina: aldehidi, ketoni, terpenoidi, hlapljive masne kiseline, alkoholi, spojevi furana, hlapljivi fenoli i esteri, derivati benzena, sumporni spojevi i derivati naftalena	7CAR/PDM <sup>c</sup> 75 μm	GC-MS; HS <sup>d</sup>	27, 28

<sup>a</sup> MM - modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima (C18) i benzensulfonskom kiselinom (engl. *Mix-Mode*)

<sup>b</sup> DI - direktan unos uzorka

<sup>c</sup> CAR/PDMS - karboksen/polidimetilsiloksan

<sup>d</sup> HS - uzorkovanje para iznad uzorka (engl. *Head Space*)

Prednosti primjene *fiber* SPME tehnike u metabolomičkim ispitivanjima u uzorcima krvi odnosno plazme u kombinaciji sa sustavom LC-MS prikazani su u studiji Bojko i suradnika (25). Kao uzorak u studiji korištena je krvna plazma pacijenata podvrgnutih operaciji srca kojima je propisana terapija transeksaminskom kiselinom. Rezultati istraživanja su pokazali da ispitani analiti omogućuju otkrivanje promjena u metaboličkim putevima izazvanih operacijom i primijenjenom farmakoterapijom. Najznačajnije promjene zabilježene su u metaboličkim profilima lizofosfolipida, triglicerida, medijatora agregacije trombocita i metabolita linolne kiseline. Uz uočavanje općih trendova u ispitivanoj skupini, kod pojedinih pacijenata zabilježeni su i individualni odgovori na terapiju koju karakteriziraju različite promjene u metaboličkom uzorku. Ovo ispitivanje je pokazalo kako *fiber* SPME tehnika kao brzi i



jednostavni alat za pripremu uzoraka mogao bi se u kombinaciji s prikladnim analitičkim metodama upotrebljavati kao brzi dijagnostički test.

Matrice koje se također koriste u metabolomičkim ispitivanjima su uzorci sline i urina, budući da je njihovo prikupljanje jednostavno, sigurno, neinvazivno i ne zahtijeva stručno osoblje.

Tako je istraživanje Bessonneau i suradnika (26) provedeno na uzorcima sline dobrovoljaca pokazalo mogućnost istodobne ekstrakcije oko 400 metabolita sa širokim rasponom polarosti (npr. aminokiseline, karboksilne kiseline, eikozanoidi, masne kiseline i fosfogliceridi), koristeći DI - SPME. Rezultati su pokazali jasnu razliku između sline muške i ženske osobe, kao i promjene u metabolomu izazvane sedmodnevnom prehranom. Također, uspoređujući dvije vrste sorbensa, uočeno je da MM SPME vlaknima (modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima (C18) i benzensulfonskom kiselinom, engl. *Mix - Mode*, MM) identificiran veći broj metabolita, nego C18 SPME vlaknima. Ovaj rezultat moguće je pripisati većoj učinkovitosti MM SPME vlakana pri ekstrakciji hidrofilnih spojeva.

*Fiber* SPME tehnika uz analizu GC-MS sustavom također je uspješno primijenjena za identifikaciju lako hlapljivih metabolita u urinu pacijenata kao potencijalnih biomarkera raka (27, 28). Rezultati ovih studija pokazali su mogućnost diferencijacije pacijenata s karcinomom od kontrolne skupine. Lako hlapljivi metaboliti koji su u najvećoj mjeri pronađeni kod pacijenata s karcinomom bili su derivati benzena, terpenoidi, ketoni, sumporni spojevi i fenoli. S obzirom na njihova fizikalno-kemijska svojstva odabran je sorbens karboksen/polidimetilsiloksan koji je nepolarnog karaktera. Nadalje, u njegovim mikroporama manji analiti zadržavaju puno bolje nego kod ostalih sorbensa (24, 27, 28).

#### 4.1.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na magnet

Istraživanja vezana uz SBSE tehniku pripreme uzoraka kao sorbens uglavnom koriste PDMS, kojim se može postići iznimno niska osjetljivost analitičkih metoda. Navedeni sorbens se zbog izrazito nepolarnog karaktera primjenjuje za ekstrakciju nepolarnih ili slabo polarnih spojeva. Da bi se polarni analiti ekstrahirali pomoću ove tehnike potrebno ih je prethodno derivatizirati s hidrofobnim spojevima, što nije uvijek moguće. Kako bi se unaprijedila primjena SBSE tehnike, potrebno je razvijati nove ekstrakcijske faze koje imaju bolji afinitet prema polarnim spojevima (29). U **Tablici 3.** prikazani su noviji SBSE sorbensi i njihova primjena u bioanalitici.

Monolitni sorbensi su visoko porozni materijali koji sadrže mrežu međusobno povezanih pora mikrometarskih veličina. Huang i suradnici (30) razvili su monolitni materijal *in situ* kopolimerizacijom estera stearil–metakrilata i etil–dimetakrilata u prisutnosti porogenog otapala, kojim se učinkovito mogu ekstrahirati i polarni i nepolarni spojevi. Primjenom SBSE tehnike uz analizu HPLC–DAD instrumentom dobivena je jednostavna, brza i osjetljiva bioanalitička metoda za određivanje šest spolnih hormona u urinu. Učinci spolnih hormona na okoliš zaokupljaju sve veću pažnju znanstvene zajednice i regulatornih agencija. Zbog široke upotrebe kontraceptiva i drugih analognih lijekova koji se koriste za liječenje hormonalnih poremećaja ili karcinoma ovi spojevi se mogu naći u otpadnim vodama. S druge strane, mnoga istraživanja se oslanjaju na praćenje hormona u biološkim tekućinama, npr. urinu. Pokazalo se da steroidni spolni hormoni mogu uzrokovati endokrine poremećaje kod ljudi i životinja pri niskim koncentracijama, a ovom metodom su se uspjeli postići niski limiti određivanja.

**Tablica 3.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena SBSE tehnika pripreme uzoraka

VUzorak	Analit	Sorbens	Analički instrument	Linearni raspon (µg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Urin	Dietilstilbestrol	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	0,1-200,0	0,06	48,0	30
Urin	Testosteron	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	4,0-200,0	0,18	21,2	30
Urin	Metiltestoseron	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	4,0-200,0	0,38	27,5	30
Urin	Progesteron	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	1,0-200,0	0,12	49,5	30
Urin	Testosteron propionat	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	1,0-200,0	0,12	80,0	30
Urin	Fenil-propionat	Monolitni sorbens	HPLC-DAD	1,0-200,0	0,18	81,8	30
Tkivo svinje	Sulfonamidi	Sulfametazin MIP	HPLC-UV	1,0-100,0	0,20-0,72	62,8-110,9	31
Jetra	Sulfonamidi	Sulfametazin MIP	HPLC-UV	1,0 -100,0	0,20-0,72	55,6-108,4	31
Tkivo pilića	Sulfonamidi	Sulfametazin MIP	HPLC-UV	1,0-100,0	0,20-0,72	66,6-102,2	31
Plazma štakora	Kofein	Alkil – diol modificirani silikagel (ADS), RAM	HPLC-UV	500-100000	25	102	32
Plazma	Mirtazapin	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	20,0-500,0	5,0	83	33

VUzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon (µg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Plazma	Citalopram	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	20,0-500,0	5,0	43	33
Plazma	Paroksetin	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	30,0-500,0	10,0	38	33
Plazma	Duloksetin	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	20,0-500,0	5,0	50	33
Plazma	Fluoksetin	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	30,0-500,0	10,0	76	33
Plazma	Sertralin	Dvofazni PDMS/PPY	LC-UV	50,0-500,0	20,0	62	33

Mogućnosti polimera s molekulskim otiskom kao sorbensa u *fiber* SPME tehnici potaknuli su Xu i suradnike (31) na razvoj analitičke metode za određivanje osam sulfonamidskih lijekova u biološkim uzorcima. Polimeri s molekulskim otiskom su sorbensi kojima je moguće postići jako veliku selektivnost metode, što je već spomenuto u poglavlju 4.1.1. Međutim, primjenom magnetske miješalice moguće je postići i brže uspostavljanje ravnoteže raspodjele analita između matrice uzorka i sorbensa u odnosu kada je sorbens postavljen na vlakno. Sulfonamidi pripadaju skupini antibakterijskih lijekova čiji se ostaci mogu naći u prehrambenim proizvodima, a potiču sve veću zabrinutost zbog njihove potencijalne kancerogenosti. U gore navedenom radu razvijen je MIP-om obložen čvrsti nosač na magnetu za selektivnu ekstrakciju sulfonamida iz prehrambenih uzoraka (meso svinjetine, jetre i piletine). Istraživanje je pokazalo da je selektivnost razvijenog MIP-a prema sulfonamidima značajno veća nego kod

nepolimernih sorbensa. Niske granice određivanja upućuju na osjetljivost metode za analizu tragova sulfonamida u složenim biološkim matricama.

Lambert i suradnici (32) upotrijebili su tzv. materijale ograničenog pristupa (engl. *Restricted Access Material*, RAM) kao SBSE sorbens kako bi ekstrahirali kofein iz plazme štakora. Ovi reaktivni sorbensi uklanjaju makromolekule, proteine i peptide iz bioloških uzoraka. Naime, male molekule ulaze u pore sorbensa i tamo stupaju u interakciju s funkcionalnim skupinama na površini pora, dok velike molekule ne mogu ući u pore sorbensa, a ne mogu se niti vezati za hidrofilnu površinu čestice sorbensa te se ispiru eluentom (2). Budući da nema potrebe za uklanjanjem proteina iz uzorka prije postupka ekstrakcije, ovom tehnikom smanjeno je vrijeme pripreme uzorka. Niski kapacitet sorbensa za vezanje proteina, visoka ekstrakcijska učinkovitost kao i ponovljivost te široki linearni raspon omogućili su razvoj analitičke metode prikladne za određivanje kofeina pomoću HPLC-a s UV detektorom (HPLC–UV) iz bioloških uzoraka.

Polimerni sorbens, koji se sastoji od dvije faze, PDMS-a i polipirola (PPY), razvijen je od strane Melo i suradnika (33) za ekstrakciju antidepresiva iz uzoraka plazme i određivanje pomoću HPLC–UV tehnike. PDMS/PPY se pokazao kao osjetljiv i selektivan sorbens s visokom ekstrakcijskom učinkovitošću jer je polipirol povećao broj interakcija između polimera i analita.

#### 4.1.3. Mikroekstrakcija tankim filmom

Različite izvedbe TFME tehnike razvijene su u svrhu pripreme raznovrsnih složenih uzoraka. Najčešće korišten sorbens u ovoj mikroekstrakciji je PDMS, koji se pokazao kao dobro

ekstrakcijsko sredstvo zbog visoke toplinske stabilnosti (34). TFME ima važnu ulogu u bioanalitičkim ispitivanjima jer se lako može primjeniti u *in vivo* studijama (Tablica 4.).

**Tablica 4.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena *in vivo* TFME tehnika pripreme uzoraka

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Literaturni navod
Slina	Metaboliti u slini (peptidi, masne kiseline, fosfogliceridi, trigliceridi); konzumirane supstance (benzokain, paracetamol, kofein); zabranjene supstance (kanabinoidi, steroidi, narkotici, $\beta$ -blokatori, stimulansi, $\beta_2$ -agonisti, glukokortikoidi, hormoni, anabolici); endogeni steroidi	HLB <sup>a</sup>	GC-MS,  LC-MS	35
Sebum	Lako hlapljivi spojevi	PDMS	GC-MS	36, 37

<sup>a</sup>HLB – hidrofilno-lipofilne ravnotežne čestice (engl. *hydrophilic lipophilic balanced particles*)

Priprema uzorka na licu mjesta (engl. *on – site sample preparation*) analitički je pristup koji se temelji na izravnom uzorkovanju iz sustava koji se ispituje. Među prednosti kombiniranja uzorkovanja i pripreme uzorka u jednom koraku ubrajaju se brzina postupka, manja vjerojatnost pogrešaka te uklanjanje rizika koji dovode do nestabilnosti analita. Tako su Bessonneau i suradnici (35) u svom istraživanju koristili TFME u formatu pločice i membrane za ekstrakciju analita iz sline dobrovoljaca. Zbog velikog omjera površine i volumena

ekstrakcijske faze, samo pet minuta *in vivo* uzorkovanja uz pomoć TFME je bilo dovoljno za ekstrakciju širokog raspona analita različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Štoviše, metoda je validirana i uspješno primijenjena za određivanje endogenih steroida iz sline, gdje je koncentracija ovih analita izrazito niska. Ovakav način uzorkovanja zajedno s prijenosnim analitičkim instrumentima mogao bi imati važnu ulogu u testiranjima na droge i doping.

Prema najnovijim znanstvenim spoznajama profil lako hlapljivih sastavnica ljudske kože moguće je primijeniti u dijagnostici i liječenju raznih poremećaja. Pod takve poremećaje svrstavaju se dekubitusi, oštećenja na koži koja ne zarastaju. Identifikacija uzroka ovakvih rana je najizazovnija, ali i najprikladnija metoda njihova liječenja. Trenutne metode koje se koriste za analizu rana su nalaz kulture brisa i eksudata rane, biopsija tkiva rane ili prosudba kliničara o klasičnim znakovima infekcije. Međutim, navedene metode su ili slabo pouzdane ili dovode do dodatnog oštećenja kože prilikom uzimanja uzorka. Razvatak neinvazivne i pouzdane metode analize je ključan za liječenje ovih kožnih oboljenja. U tu svrhu korišten je tanki film PDMS-a za *in vivo* uzorkovanje lako hlapljivih spojeva iz ljudske kože (36, 37). Postupak uzorkovanja uključivao je izravno postavljanje membrane na površinu kože (**Slika 15.**).



**Slika 15.** Prikaz primjene TFME u formatu membrane za *in vivo* uzorkovanje (prilagođeno prema literaturnom navodu 36).

#### 4.1.4. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari

IT – SPME je tehnika pripreme uzoraka čije različite mogućnosti izvedbe su i njena najveća prednost. Otkada se počela upotrebljavati kao dio analitičkih metoda, koristi se na dva različita načina. U jednom od njih uzorak kontinuirano prolazi kroz kapilaru, jednom i samo u jednom smjeru (protočni način rada), a u drugom se uzorak više puta aspirira/dozira (cikličko izbacivanje). U prvom načinu rada uzorak se može uvesti ručno ili automatizirano, dok je za drugi neophodan automatski uređaj za uzorkovanje s pumpom (38). Ova tehnika se najčešće povezuje s tekućinskom kromatografijom, a što se tiče primjene u bioanalitici, plazma i urin su najčešće analizirane matrice (**Tablica 5.**).

Yashura i suradnici (39) su razvili bioanalitičku metodu za istovremeno određivanje hormona povezanih sa stresom iz ljudske sline. To su postigli automatizacijom uzorkovanja i *on – line* povezivanjem IT – SPME i LC–MS/MS tehnika. Metoda je jednostavna, automatizirana, brza,



selektivna i osjetljiva te ju je lako moguće primijeniti za analizu malih količina uzoraka slina bez prethodne obrade osim ultrafiltracije. Praćenjem promjene u koncentraciji kortizola (CRT) i dehidroepiandrosterona (DHEA) vrlo je korisno za objektivnu procjenu stresa. Vrlo slična metode razvijene su za određivanje testosterona i anaboličkih steroida iz slina i urina (40, 41). Zanimljiv pristup za određivanje diklofenaka iz urina imala je istraživačka grupa Ahmadi i suradnika (42). Oni su kombinacijom elektrokemije i *in – tube* SPME uspjeli smanjiti ukupno vrijeme analize, a istovremeno poboljšati osjetljivost. Prvo su elektropolimerizirali pirol na unutrašnjoj stijenci kapilare da bi nastao polipirol koji je služio kao sorbens u kapilari, te potom *on – line* povezali mikroekstrakciju s HPLC-om. Kapilara obložena polipirolom se u ovom slučaju ponašala kao elektroda koja je privlačila diklofenak. Ispitivana je ekstrakcijska učinkovitost u prisustvu električnog polja, kao i bez njega. U istim uvjetima ekstrakcije ekstrakcijska učinkovitost je bila veća kada se koristio konstantni potencijal. Ista skupina dobila vrlo slične rezultate upotrebom iste metode za određivanje naproksena (43).

**Tablica 5.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena IT - SPME tehnika pripreme uzoraka

Uzorak	Analit	Sorbens	Analički instrument	Linearni raspon (µg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Slina	CRT <sup>a</sup>	Supel-Q PLOT <sup>c</sup>	LC-MS/MS	0,005-1	0,0009	> 94	39
	DHEA <sup>b</sup>			0,05-1	0,013		
Slina	Testosteron	Supel-Q Plot	LC-MS/MS	0,002-0,5	0,0003	> 94	40

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon (µg/L)	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Urin	Anabolički steroidi	Supel-Q Plot	LC-MS/MS	0,5-20	0,009-0,182	> 85	41
Urin	Diklofenak	PPY	HPLC-UV	0,5-1000	0,1	94,8	42
Urin	Naproksen	PPY	HPLC-UV	0,5-1000	0,07	92-99	43
Plazma	Ketoprofen	Monolitni	LC-MS	10-1000	2,63	88-99	44
	Fenbufen	sorbens		10-1000	2,01	89-98	
	Ibuprofen			20-1000	4,77	112-99	
Plazma	Lidokain, MEGX <sup>d</sup>	OV-1701 <sup>e</sup>	HPLC-UV	50-5000	15-20	95-117	45
Plazma	Rifampicin	PEG	HPLC-UV	100-100000	100	-	46

<sup>a</sup>CRT – Kortizol

<sup>b</sup>DHEA - Dehidroepiandrosteron

<sup>c</sup>Supel – Q Plot-polimer divinilbenzena debljine 17 µm

<sup>d</sup>MEGX - monoetil-glicin-ksilidid

<sup>e</sup> OV-1701 – 14 % cijanopropil–fenil–metilpolisiloksan

Monolitni sorbens na bazi vinilpiridina razvijen je za potrebe istraživanja Yu i suradnika (44) te je primijenjen kao ekstrakcijska faza u automatiziranoj analizi nesteroidnih protuupalnih lijekova iz plazme pacijenata pomoću IT – SMPE tehnike pripreme uzorka, *on – line* povezane s LC–MS tehnikom. Ketoprofen, fenbufen i ibuprofen su analiti koji se ponašaju kao kiseline pa se stoga ovakav sorbens kojem je mehanizam separacije baziran na ionskoj izmjeni i hidrofobnim interakcijama pokazao idealnim za njihovu ekstrakciju.

Lidokain je lokalni anestetik koji se može primjenjivati centralnom (spinalnom i epiduralnom) ili perifernom administracijom. Njegovim metabolizmom u jetri nastaje velik broj metabolita, među kojima i monoetil-glicin-ksilidid (MEGX). Procesi poput apsorpcije i distribucije lijeka u

ljudskom tijelu ovise o mnogo čimbenika. Disfunkcija ili promjena u aktivnosti organa zbog dijagnosticirane bolesti ili trudnoće utječu na farmakokinetiku lijekova. Tako je i volumen distribucije lidokaina smanjen u trudnica s dijagnosticiranim gestacijskim dijabetesom u odnosu na zdrave trudnice. Zbog toga je važan razvoj analitičke metode kojom je moguće odrediti koncentraciju lokalnih anestetika u biološkim tekućinama kako bi se lijek primjereno dozirao i smanjila mogućnost nuspojava. Caris i suradnici (45) predložili su automatiziranu *on-line* IT – SPME tehniku povezanu s HPLC–UV tehnikom za određivanje lidokaina i njegovih metabolita u plazmi pacijenata. Rezultati validacije su pokazali kako je metoda osjetljiva, selektivna i ponovljiva te je potom uspješno primijenjena u farmakokinetičkoj studiji koja je uključivala trudnice s gestacijskim dijabetesom podvrgnute epiduralnoj anesteziji.

Tuberkuloza i dalje pripada vodećim javnozdravstvenim problemima kao jedna od najsmrtonosnijih infektivnih bolesti. Prva linija obrane u borbi protiv ove bolesti je antibiotik rifampicin, a na njegovo antituberkulotsko djelovanje usko utječe koncentracija lijeka kojem je bakterija izložena. S druge strane, potencijalne nuspojave ovog lijeka su hepatotoksičnost, alergijski osip, gubitak apetita, mučnina i imunološki poremećaji. Praćenje koncentracije rifampicina u plazmi pacijenta trenutno se ne provodi kod pacijenata oboljelih od tuberkuloze. Stoga bi razvoj jednostavne i pouzdane bioanalitičke metode predstavljao veliki značaj u personaliziranoj brizi za zdravlje pacijenata oboljelih od tuberkuloze. Melo i suradnici (46) razvili su osjetljivu metodu za određivanje koncentracije rifampicina u plazi koja uključuje njegovu ekstrakciju polietilenglikolom (PEG) kao sorbensom smještenim u kapilari te *on-line* analizu uzoraka tekućinskom kromatografijom.

#### 4.1.5. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u igli

Uz *fiber* SPME tehniku među najzastupljenije tehnike mikroekstrakcije u bioanalitici ubraja se i mikroekstrakcija zapakiranim sorbensom (MEPS) (8). U posljednje vrijeme razvijen je veliki broj bioanalitičkih metoda koje koriste MEPS tehnologiju, a većinom su usredotočene na lijekove koji se već koriste u kliničkoj praksi (**Tablica 6.**). MEPS tehnika je vrlo pogodna za rukovanje s malim volumenima uzoraka krvi (25 – 50 µL) što ju čini prikladnom tehnikom u pretkliničkim farmakokinetičkim studijama jer doprinosi poštivanju etičkih načela o upotrebi laboratorijskih životinja u biomedicinskim istraživanjima. Uz to, MEPS pruža nove mogućnosti za terapijsko praćenje lijekova kod novorođenčadi, male djece i kritično bolesnih pacijenata (47).

Opioidni analgetici su lijekovi velike terapijske vrijednosti za ublažavanje boli u određenim medicinskim stanjima, a još se koriste i kao pomoćni lijekovi u općoj anesteziji. Opioidi su povezani s uskim terapijskim indeksom i potencijalnom toksičnošću koja može biti opasna po život pacijenta. Stoga razumijevanje njihove farmakokinetike i praćenje koncentracije u plazmi mogu uvelike poboljšati njihovu kliničku uporabu (48).

**Tablica 6.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena MEPS tehnika pripreme uzoraka

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon µg/L	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
DBS	Metadon	C18	HPLC-CD	4-500	1,2	> 90	49
Plazma	Buprenorfin	C8	HPLC-CD	0,25-20,0	0,08	89-96	50
	Norbuprenorfin			0,25-20,0	0,08	88-95	

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon µg/L	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
	Metadon			3-1000	0,90	90-94	
	Naproksen			0,13-10,0	0,04	86-93	
Plazma i slina	Okskarbazepin	C18	HPLC-DAD	100-5000	15	> 86,5	51
	10,11-dihidro-10- hidroksikarbamazepin			250- 20000	37		
	Trans-10,11-dihidro-10,11- dihidroksikarbamazepin			250- 40000	37		
	3-hidroksikarbamazepin			100-5000	15		
Plazma i urin	Okskarbazepin	C18	GC-MS	0,1-500	0,0020 (0,0018) <sup>a</sup>	84,5-99,4	52
	Karbamazepin				0,0029 (0,0038)	69,9-98,4	
	Fenitoin				0,0027 (0,0029)	89,9-99,1	
	Alprazolam				0,0021 (0,0023)	80,2-98,9	
Plazma i urin	Fenobarbital	C18	HPLC-UV	5-500	0,593 (0,561)	88,56- 99,38	53
	Fenitoin			1-500	0,147 (0,114)		
	Karbamazepin			1-500	0,109 (0,105)		

Uzorak	Analit	Sorbens	Analitički instrument	Linearni raspon µg/L	Limit dokazivanja (LOD, µg/L)	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
	Primidon			1-500	0,140 (0,166)		
	Okskarbazepin			1-500	0,040 (0,042)		
Plazma	Busulfan	Polistiren	LC-MS/MS	5-2500	10 <sup>b</sup>	~ 60	54
Plazma	Ciklofosamid	C2	LC-MS/MS	500-150000	0,5	-	55
Serum	Atorvastatin	C8	UHPLC-MS/MS	0,5-100 nM	0,03 nM	89-116	56
	Atorvastatin lakton				0,15 nM		
	<i>p</i> -hidroksi-atorvastatin				0,33 nM		
	<i>o</i> -hidroksi-atorvastatin				0,15 nM		
Plazma štakora	Pravastatin	C8	UHPLC-MS/MS	5-500 nM	1,5 nM	97-109	57
Urin štakora	Pravastatin lakton					92-101	
	Pravastatin						
	Pravastatin lakton						

<sup>a</sup> vrijednosti izražene u zagradi odnose se na uzorke urina

<sup>b</sup> vrijednost je izražena kao limit određivanja (LOQ)

Metadon je trenutno jedan od lijekova koji se najčešće koristi u programima za odvikavanje pacijenata od ovisnosti o opijatima. Međutim, zabilježeni su smrtni slučajevi povezani s predoziranjem metadonom tijekom njegove indukcije u terapiju. Saracino i suradnici (49) razvili su metodu za određivanje metadona u uzorku suhe kapi krvi na filter papiru (engl. *Dried Blood Spot*, DBS) kod pacijenata koji su podvrgnuti terapiji odvikavanja metadonom. Metoda uključuje grijanje uzorka u mikrovalnoj pećnici, a zatim ekstrakciju analita pomoću MEPS

tehnike. Za određivanje analita optimizirana je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti obrnutih faza s kulometrijskim detektorom (engl. *High Performance Liquid Chromatography with Coulometric Detection*, HPLC–CD). Upotreba DBS-a pruža brojne prednosti kao što su uzorkovanje malog volumena uzorka, jednostavna priprema, pohrana i dostava uzoraka (stabilnost analita kroz duži vremenski period). Predložena metoda je brza i ekonomski prihvatljiva, a visoko selektivni detektor osigurava analizu metadona u složenoj matrici kao što je puna krv. Sličnu metodu koristili su Somaini i suradnici (50) kako bi istovremeno odredili buprenorfin, norbuprenorfin, metadon i nalokson u plazmi pacijenata ovisnih o drogama.

Posljednjih godina razvijeni su analitički postupci koji koriste MEPS tehniku za pripremu uzoraka plazme, mokraće i sline za određivanje koncentracije antiepileptičkih odnosno antikonvulzivnih lijekova i njihovih metabolita (51, 52, 53) (**Tablica 6.**). Analiza antiepileptičkih lijekova u plazmi ili serumu pacijenata od velikog je kliničkog interesa za rutinsko terapijsko praćenje njihove koncentracije, posebno onih prve generacije (fenobarbital, fenitoin i kabamazepin). Razvoj ovakvih bioanalitičkih metoda iznimno je važan za personaliziranu brigu za zdravlje ranjivih skupina pacijenata. Saracino i suradnici (51) razvili su HPLC–DAD metodu za praćenje koncentracije okskarbazepina i njegovih metabolita u plazmi i slini pacijenata, primjenjujući MEPS tehniku za obradu uzoraka malih volumena (25 µl). Unatoč tako malom volumenu uzoraka, uspjeli postići ekstrakcijsku učinkovitost od 86,5 %.

Rani i suradnici (52, 53) također su razvili i validirali dvije metode za određivanje nekoliko antiepileptičkih lijekova u uzorcima plazme i urina koristeći MEPS/GC–MS i MEPS/HPLC–UV tehnike. Tri lijeka (okskarbazepin, karbamazepin i fenitoin) bila su zajednička u oba ispitivanja, a vrijednosti limita detekcije i određivanja (LOD i LOQ) bile su minimalno deset puta niže kod

GC/MS. Dobivena visoka vrijednost ekstrakcijske učinkovitosti u oba ispitivanja pokazuje koliko je učinkovita MEPS tehnika za ekstrakciju antiepileptika iz uzoraka plazme i urina.

MEPS tehniku u bioanalitičkim ispitivanjima antitumorskih lijekova primijenili su Abdel-Rehim i suradnici (54,55). Međutim, MEPS se još uvijek ne koristi za bioanalizu kemoterapeutika u onoj mjeri u kojoj bi se moglo očekivati, unatoč tome što je njena primjena puno sigurnija za analitičare jer smanjuje njihovu izloženost tim lijekovima. Za određivanje busulfana razvijena je metoda kojom se MEPS *on – line* povezuje s LC–MS/MS sustavom. Uzorci plazme pacijenata koji su korišteni u ovoj analizi imali su volumen 50  $\mu$ l, a uzorci su bili pripremljeni za manje od jednu minutu, što je od velikog značaja prilikom prilagođavanja doze busulfana u kliničkim uvjetima (54). Što se tiče analize ciklofosfamida MEPS/LC–MS/MS metodom, rukovanje uzorkom i vrijeme analize su svedeni na najmanju moguću mjeru (55).

Atorvastatin i pravastatin su lijekovi za snižavanje kolesterola koji pripadaju farmakološkoj skupini statina. Praćenje njihove koncentracije u krvi pacijenata oboljelih od dislipidemije nije u rutinskoj primjeni u bolnicama, ali u određenim kliničkim okolnostima moglo bi biti korisno nadzirati njihovu razinu u serumu. Vlčková i suradnici (56) razvili su metodu tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti spregnutu s tandemskom masenom spektrometrijom (engl. *Ultra High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*, UHPLC–MS/MS) za određivanje atorvastatina i metabolita u malom volumenu (50  $\mu$ l) seruma pacijenata koji je prethodno obrađen MEPS tehnikom. Ova bioanalitička metoda je uspješno validirana te je pokazala dobru linearnost u rasponu od 0,5 do 100 nM za sve analite (**Tablica 6.**) Također, Vlčková i suradnici (57) razvili su MEPS/UHPLC–MS/MS metodu za analizu pravastatina i njegovog laktonskog metabolita u uzorcima plazme i mokraće štakora koristeći prethodno navedeni MEPS protokol (57).



#### 4.1.6. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete

Kao što je već navedeno u poglavlju 3.2.1.6., velika prednost *in – tip* SPME tehnike je mogućnost istovremene pripreme većeg broja uzoraka (čak do 96 uzoraka) te mogućnost automatizacije postupka pripreme. Iako bi koncept njene automatizacije s kromatografskim metodama (2, 7, 15, 16) bio koristan u bioanalitičkim ispitivanjima, pregledom literature utvrđeno je kako je ograničen broj objavljenih metoda.

Međutim, Xie i suradnici (58) proveli su studiju u kojoj su koristili *in – tip* SPME tehniku u formatu pločice s 96 jažica kako bi ispitali izvedivost automatizacije SPME. Postupak pripreme uzoraka, uključujući ekstrakciju i desorpciju, bio u potpunosti automatiziran i povezan s tekućinskim kromatografom. Istraženo je nekoliko parametara, uključujući vrijeme i brzinu ekstrakcije i desorpcije. Razvijena i validirana metoda omogućila je pouzdano određivanje koncentracije modulatora peroksisom proliferator aktiviranog receptora gama (MK – 0533) iz ljudske plazme te samim time prikazala prikladnost ovakvog pristupa. Potrebno je istaknuti kako lijekovi ovog mehanizma djelovanja se koriste u terapiji dijabetesa tipa 2. Donja granica određivanja ove metode (LOQ) pri obradi 0,25 mL uzorka ljudske plazme iznosila je 5 ng/mL, a validirana je u rasponu koncentracija od 5 do 2000 ng/mL. Provedeno ispitivanje upućuje na to da se ova tehnika vrlo lako automatizira te ima veliki potencijal za primjenu u bioanalitičkim ispitivanjima.

#### 4.2. Odabrani primjeri tehnika mikroekstrakcije tekućom fazom

Pretraživanjem literature moguće je lako zaključiti kako je upotreba SPME tehnike zastupljenija u bioanalitici u odnosu na LPME. Premda se često ističu prednosti SPME tehnika i one pokazuju određene nedostatke, npr.: relativno niska radna temperatura (obično u području od 240 do 280 °C), nestabilnost vlakana u organskim otapalima (što uvelike ograničava njihovu upotrebu s HPLC-om), lomljivost vlakana, skidanje sorbensa s čvrstih nosača te savijanje igli na brizgalicama i njihova cijena. S druge strane, LPME se pokazala kao dobra alternativa te je stekla određenu popularnost u bioanalitici, uglavnom zahvaljujući svojoj jednostavnosti, ekonomskoj prihvatljivosti i činjenici da su za analizu potrebni mali volumeni uzorka i organskih otapala. Međutim, LPME tehniku je izazovno automatizirati i to doista narušava njenu širu primjenu u rutinskim analizama. Nadalje, zbog male količine ekstrakcijske faze dobivaju se izuzetno niski prinosi, što joj ograničava primjenu u određivanju analita u tragovima što često predstavlja zahtjev bioanalitičkih metoda. Posljednjih godina razvoj LPME tehnike je išao u dva smjera: prilagođavanje tehnike kako bi bila prikladna za ekstrakciju polarnih analita te postizanje kraćeg vremena ekstrakcije. Što se tiče primjene u bioanalitici, u današnje vrijeme najčešće korištena od LPME tehnika je HF - LMPE (59). U **Tablici 7.** su detaljnije prikazane neke primjene ovih tehnika u pripremi bioloških uzoraka.

**Tablica 7.** Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima je korištena LPME tehnika pripreme uzoraka

Uzorak	Analit	Metoda ekstrakcije	Donorska/akceptorska faza	Analitički instrument	Linearni raspon ( $\mu\text{g/L}$ )	Limit dokazivanja (LOD, $\mu\text{g/L}$ )	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod
Urin	Metamfetamin	SDME s tri faze: donorska/ organska/ akceptorska	NaOH/ n-heksan/ $\text{H}_3\text{PO}_4$	HPLC-UV	1,0- 1500	0,5	95,1- 107,9	60
	Amfetamin						96,8- 99,4	
Plazma i urin	Fentanil	SDME s tri faze: donorska/ organska/ akceptorska	NaOH/ n-oktan/ $\text{HClO}_4$	HPLC-UV	0,5- 1000	0,1	49	61
Urin	Klenbuterol	HF-LMPE s dvije faze	NaOH/ Metilbenzol	GC-MS	0,25- 200	0,10	93,79- 109,04	63
	Metoprolol				0,25- 400	0,08		
	Propranolol				0,25- 400	0,05		

Uzorak	Analit	Metoda ekstrakcije	Donorska/akceptorska faza	Analički instrument	Linearni raspon ( $\mu\text{g/L}$ )	Limit dokazivanja (LOD, $\mu\text{g/L}$ )	Ekstrakcijska učinkovitost (%)	Literaturni navod	
Plazma	Tramadol	HF-LPME s tri faze: donorska/ organska/ organska akceptorska	Vodena otopina/ n-dodekan/ acetonitril	GC-MS	0,1-400	0,08	87,5- 90,7	64	
Urin							93,6- 95,2		
Urin	Akonitin	HF-LPME s tri faze: donorska/ organska/ akceptorska	NaOH/ 1-oktanol/ HCl	HPLC-UV	16,0- 128,0	0,8	84,4- 106,2	65	
	Hipakonitin						11,0- 88,0		77,3- 85,6
	Mesakonitin						8,1- 64,8		90,1- 100,8
Plazma	Heksanal	DLLME-SFO: disperzivno/ ekstrakcijsko otapalo	Metanol/ 1-dodekanol	HPLC-UV	0,01-5 $\mu\text{mol/L}$	7,90 nmol/L	69,01- 70,21	66	
	Heptanal					2,34 nmol/L	67,84- 70,28		

#### 4.2.1. Mikroekstrakcija jednom kapi

Mikroekstrakcija jednom kapi s tri faze je inovativan pristup analize ionizirajućih lijekova, gdje se analit u neutralnom obliku prvo ekstrahira iz vodene donorske faze u tanki sloj organskog

otapala, a zatim ioniziran opet u kap akceptorske vodene faze koja se uvlači nazad u mikrobrizgalicu i injektira direktno u kromatografski sustav za analizu. Ova dva ravnotežna stanja pružaju visoku selektivnost procesa jer većina interferencija koja se ekstrahira u organski sloj nije ionizirajuća (59).

He i Kang koristili su SDME za određivanje sintetičke droge metamfetamina i njegovog glavnog metabolita amfetamina u urinu ovisnika (60). Za određivanje amfetamina u forenzičkim ispitivanjima obično se koristi GC–MS tehnika. Međutim, nedostatak metode je što je analite potrebno prethodno derivatizirati. Stoga je posljednjih godina tekućinska kromatografija postala tehnika izbora za određivanje metamfetamina u biološkim uzorcima. Mikroekstrakcija jednom kapi s tri faze, donorskom (uzorak), organskom i akceptorskom, u kombinaciji s HPLC analizom pokazala se kao pouzdana metoda za prepoznavanje zloupotrebe droga.

Isti princip koristili su Ebrahimzadeh i suradnici (61) za određivanje fentanila u biološkim uzorcima. Fentanil se koristi kao potentni analgetik u obliku transdermalnog flastera za liječenje kronične boli. Analit se prvo ekstrahirao iz otopine NaOH (donorska faza) u tanki sloj organskog otapala i zatim u mikrokap kisele akceptorske faze koja je potom analizirana HPLC tehnikom. Istraženi su i optimizirani parametri koji utječu na učinkovitost ekstrakcije, uključujući organsko otapalo i njegov volumen, volumen mikrokapi, sastav donorske faze, brzinu miješanja, temperaturu, dodavanje soli te vrijeme ekstrakcije. Pri optimalnijim uvjetima ekstrakcije faktor obogaćenja bio je 355.

#### 4.2.2. Membranom potpomognuta mikroekstrakcija

HF – LPME je stekla važnost u bioanalitičkim ispitivanjima zbog svoje jednostavnosti, niske cijene i lake automatizacije. Uz to, pažljivim odabirom parametara ekstrakcije moguće je postići dobru selektivnost i nisku osjetljivost analitičkih postupaka. Također, i ova tehnika se može izvoditi u dvo- ili trofaznom načinu rada (59).

Dvofazna HF - LPME tehnika, koja je uključivala kombinirani postupak derivatizacije i ekstrakcije, primijenjena je u bioanalitici. Derivatizacijom se povećao koncentracijski gradijent i posljedično poboljšao prinos ekstrakcije (62).

Klenbuterol je najčešće korišten  $\beta$  - agonist u sportu jer može pospješiti rast mišićnog tkiva. Metoprolol i propranolol pripadaju skupini  $\beta$  - blokatora koji mogu smanjiti broj otkucaja srca i mišićni tremor. S obzirom na navedeni učinak ovi lijekovi se zloupotrebljavaju u natjecanjima u streljaštvu i bilijaru. Liječničko povjerenstvo Međunarodnog olimpijskog odbora postavilo je dozvoljenu razinu ovih lijekova u urinu natjecatelja (0,5 g/mL). Liu i suradnici (63) razvili su metodu za određivanje  $\beta$ -agonista i  $\beta$ -blokatora u urinu pacijenata koristeći HF - LPME zajedno s *in situ* derivatizacijom uz analizu GC-MS tehnikom. Smjesa derivatizirajućeg agensa i organskog otapala unutar lumena šupljeg vlakna korištena je kao ekstrakcijski medij te je na taj način smanjena količina organskog otapala i pojednostavljena priprema uzorka. Predložena metoda je ekonomski i ekološki prihvatljiva te se pokazala primjenjivom za istodobnu analizu većeg broja uzorka. Razvoj ove metode može olakšati praćenje zloupotrebe lijekova u natjecateljskim sportovima.

HF - LPME s tri faze, koja se temelji na primjeni dvaju otapala koja se međusobno ne miješaju u lumenu i porama šupljeg vlakna, Ghambarian i suradnici (64) primjenili su u svom radu za analizu tramadola, još jednog opioidnog analgetika u uzorcima plazme i urina. Nakon

ekstrakcije, organska akceptorska faza izravno je injektirana u GC–MS sustav. Dvije su glavne prednosti ove tehnike: prvo, kompatibilna je s GC instrumentom zbog upotrebe organskog otapala kao akceptorske faze. Drugo, kao akceptorska faza najčešće se koriste acetonitril ili metanol koji se lako odvajaju od kromatografskih pikova analita u usporedbi s otapalima koja se uobičajeno koriste u dvofaznoj HF - LPME. Također, otkriveno je da vrijeme ekstrakcije, brzina miješanja te duljina šupljeg vlakna su važni čimbenici koji doprinose ekstrakcijskoj učinkovitosti.

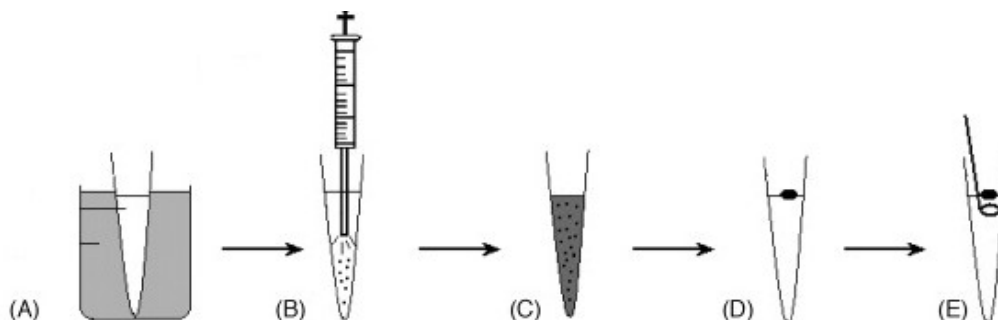
Gomolji iz *Aconitum* porodice biljaka koriste za liječenje mnogih bolesti kao što su prehlada, proljev, oštećenje sluha, depresija, beri-beri i edem više od dvije tisuće godina. Međutim, kod nepravilne obrade biljnih pripravaka moguće je trovanje alkaloidima te je stoga nužan razvoj analitičke metode za njihovu identifikaciju i određivanje u svrhu kontrole sigurnosti ovih pripravaka. Yang i suradnici (65) upotrijebili su HF - LPME zajedno s HPLC-UV tehnikom za istovremeno određivanje alkaloida iz *Aconitum* porodice biljaka u urinu pacijenata. U ovom ispitivanju analiti su ekstrahirani HF - LPME tehnikom s tri faze iz uzorka urina koji je sadržavao NaOH u oktanol kojim je bila impregnirana membrana, a zatim nazad u kiselu vodenu otopinu u lumenu šupljeg vlakna. Nakon ekstrakcije akceptorska faza je analizirana HPLC tehnikom. Za razvoj ekstrakcijskog postupka bilo je potrebno optimizirati parametre ekstrakcije poput vrste organskog otapala, vremena ekstrakcije, brzine miješanja, pH donorske i akceptorske faze, temperature i volumena akceptorske faze. Ovim pristupom postignuta je niska osjetljivost i visoka ekstrakcijska učinkovitost metode prikladne za analizu spojeva niskih koncentracija u biološkim matricama.

#### 4.2.3. Disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće

Aldehidi su produkti razgradnje lipida i staničnih sastavnica posredovanih slobodnim radikalima. Povišene razine u krvi su indikativne za patološka stanja, a također su prepoznati kao biomarkeri za rak. Iako bi se za njihovu identifikaciju mogli primijeniti razni analitički postupci, njihova kvantifikacija zahtijeva prethodnu derivatizaciju zbog velike polarnosti, kemijske nestabilnosti i odsutnosti kromofora u ovih analita. Lili i suradnici (66) razvili su tehniku disperzivne ekstrakcije tekuće - tekuće koja zasnovana na skrućivanju plutajućih organskih kapljica (engl. *Dispersive Liquid – Liquid Microextraction method based on Solidification of a Floating Organic drop*, DLLME - SFO) kako bi analizirali složene uzorke krvi. Izvedivost ove tehnike istražena je u kombinaciji s HPLC-om za određivanje koncentracije heksanala i heptanala u serumu zdravih ljudi i pacijenata oboljelih od karcinoma pluća. DLLME je jednostavna i brza tehnika mikroekstrakcije koja se temelji na upotrebi odgovarajućeg ekstrakcijskog i disperzivnog otapala, što je već spomenuto u poglavlju 3.3.1.1. Međutim, izbor ekstrakcijskog otapala je ograničen u ovoj tehnici. Uvjet koji je potrebno ostvariti jest taj da je gustoća ekstrakcijskog otapala veća od gustoće vode i stoga se najčešće primjenjuju klorobenzen, kloroform, tetraklormetan i ugljikov disulfid, otapala koja su toksična i štetna za okoliš. Uzimajući u obzir ove nedostatke, razvijena je nova tehnika u kojoj se koristi otapalo niske gustoće i visoke točke ledišta, koje pluta na površini uzorka, a potom se može jednostavno skrutnuti upotrebom ledene kupke i izolirati iz matrice uzorka. U gore navedenom postupku, uzorak koji je sadržavao heksanal i heptanal prvo je podvrgnut postupku derivatizacije analita. Potom je u uzorak dodana smjesa disperzivnog i ekstrakcijskog otapala niske gustoće. Nakon centrifugiranja kapljice organskog otapala su plutale na površini uzorka koji je onda smješten u ledenu kupku gdje su se kapljice skrutnule. Čvrsto otapalo je



premješteno u bočicu za uzorkovanje HPLC tehnikom gdje se brzo otopilo na sobnoj temperaturi te se provela analiza uzorka HPLC tehnikom (**Slika 16.**). Rezultati su pokazali kako je ovakva metoda jednostavna, ekonomski prihvatljiva, brza, osjetljiva i pouzdana za analizu aldehida u složenim matricama uz minimalnu potrošnju organskih otapala što ju čini i ekološki prihvatljivom.



**Slika 16.** Shematski prikaz DLLME – SFO tehnike primijenjene za analizu aldehida u uzorcima plazme. (A) Postupak derivatizacije analita u vodenoj kupki; (B) dodavanje ekstrakcijskog i disperzijskog otapala; (C) formiranje mutne otopine; (D) centrifugiranje i skrućivanje u ledenoj kupki; (E) prenošenje uzorka u analitički instrument (prilagođeno prema literaturnom navodu 66).

## 5. ZAKLJUČAK

U ovom preglednom radu opisana je i klinički razmotrena primjena različitih vrsta tehnika mikroekstrakcije za ukoncentriravanje različitih spojeva u biološkim uzorcima. Kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima, biološki uzorci imaju vrlo složene matrice koje mogu interferirati u ovakvim analizama. Čimbenike kao što su vrsta analita, matrica uzorka, vrijeme potrebno za analizu, ekonomska prihvatljivost, učinkovitost i ponovljivost ključno je razmotriti pri odabiru prikladne tehnike pripreme uzoraka.

Posljednjih godina znatno se povećala upotreba mikroekstrakcije u bioanalitici, i to najviše za određivanje terapijske doze lijekova, kao i farmakokinetička i metabolomička ispitivanja. Ove tehnike omogućuju automatizaciju, minijaturizaciju i visoku učinkovitost analitičkih metoda, a također skraćuju ukupno vrijeme analize. Uz to, mogu se povezati s mnogim analitičkim instrumentima poput GC–MS i HPLC–MS što dodatno proširuje njihovu primjenu za ekstrakciju različitih spojeva. Navedene značajke otvaraju i nove mogućnosti primjene za razne *in vitro* i *in vivo* studije.

Bez sumnje razvoj tehnika mikroekstrakcije nastavit će se i u budućnosti u smislu još osjetljivijih i selektivnijih ekstrakcijskih faza što može dovesti do daljnje minijaturizacije ovih tehnika, kao i veće automatizacije pripreme uzoraka kako bi se ove metode još više ubrzale, a preciznost i pouzdanost poboljšale. Međutim, nailazit će se na još puno izazova u tom procesu. Npr. mnogi dostupni SPME sorbensi su skupi i imaju ograničen vijek trajanja te se ne mogu iskoristiti za više analiza. Nadalje, razlike u njihovoj duljini, debljini i ostalim svojstvima od proizvođača do proizvođača sorbensa rezultiraju različitim ekstrakcijskim učinkovitostima i dovode do niza problema s ponovljivošću metoda. Štoviše, pronalazak sigurnijih i niskotoksičnih ekstrakcijskih otapala povećali bi zelene aspekte LPME tehnika. Stoga je nužno provesti još više istraživanja kako bi se otkrile sve prednosti i ograničenja ovih tehnika.

## 6. LITERATURA

1. Pandey S, Pandey P, Tiwari G, Tiwari R. Bioanalysis in drug discovery and development. *Pharm Methods* 2010;1:14-24.
2. Mornar Turk A. Primjena ekstrakcije čvrstom fazom u bioanalitici; 2016, str. 1-25.
3. American Laboratory: A simplified spproach to bioanalytical sample preparation. Available at: <https://www.americanlaboratory.com/914-Application-Notes/172516-A-Simplified-Approach-to-Bioanalytical-Sample-Preparation/>. Accessed June 25, 2019.
4. Mornar Turk A, Nigović B, Amidžić Klarić D, Jeličić ML, Brusač E. Ekstrakcija čvrstom fazom - primjena u bioanalitici. *Farmaceutski glasnik* 2020;76:353-394.
5. Kabir A, Locatelli M, Ulusoy HI. Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation. *Separations* 2017;4:4-36.
6. Ocaña-González JA, Fernández-Torres R, Bello-López MÁ, Ramos-Payán M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. *Anal Chim Acta* 2016;905:8–23.
7. Katoka H. Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses. *Anal Sci* 2011;27:893-905.
8. Silva C, Cavaco C, Perestrelo R, Pereira J, Câmara JS. Microextraction by packed sorbent (MEPS) and solid-phase microextraction (SPME) as sample preparation procedures for the metabolomic profiling of urine. *Metabo* 2014;4:71-97.
9. Chromedia: Principles of SPME. Dostupno na: <https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=npuhcHsHiemBpdmBIIcCKJ&subNav=abfffyDsHiemBpdmBIIcCtBDF>. Pristupljeno 4. prosinca 2019.
10. Szultka M, Pomastowski P, Railean-Plugaru V, Buszewski B. Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis. *J Sep Sci* 2014;37:3094-3105.

11. Baltussen E, Sandra, P, David, F, Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J. Microcolumn Sep.* 1999; 11:737–747.
12. Bruheim I, Liu X, Pawliszyn J. Thin-film microextraction. *Anal Chem* 2003;75:1002-1010.
13. Manousi N, Tzanavaras PD, Zacharis CK. Bioanalytical HPLC Applications of In-Tube Solid Phase Microextraction: A Two-Decade Overview. *Molecules* 2020;25:2096.
14. Kataoka H, Saito K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analyses. *J Pharm Biomed Anal* 2010;54:926-950.
15. Merkle S, Kleeberg KK, Fritsche J. Recent developments and applications of solid phase microextraction (SPME) in food and environmental analysis-a review. *Chromatogr* 2015;2:293-381.
16. Owczarek K, Szczepańska N, Płotka-Wasyłka J, Namieśnik J. New achievements in the field of extraction of trace analytes from samples characterized by complex composition of the matrix. In: *Green Chemistry and Sustainable Technology*. Singapore: Springer Singapore; 2019. p. 103–50.
17. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *TrAC-Trend Anal Chem* 2010;29:1-14.
18. Plotka-Wasyłka J, Namieśnik J. Green analytical chemistry: past, present and perspectives; 2019, str. 136-137.
19. Grushka E, Grinberg N. *Advances in Chromatography*; 2009, str.363.
20. Quigley A, Cummins W, Connolly D. Dispersive liquid-liquid microextraction in the analysis of milk and dairy products: a review. *J Chem* 2016;2016:1-12.

21. Hashemi B, Zohrabi P, Shamsipur M. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*. 2018;187:337–47.
22. Szultka M, Krzeminski R, Jackowski M, Buszewski B. Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2013;940:66–76.
23. Abrão LC de C, Figueiredo EC. A new restricted access molecularly imprinted fiber for direct solid phase microextraction of benzodiazepines from plasma samples. *Analyst*. 2019;144(14):4320–30.
24. Bojko B, Reyes-Garcés N, Bessonneau V, Goryński K, Mousavi F, Souza Silva EA, et al. Solid-phase microextraction in metabolomics. *Trends Analyt Chem*. 2014;61:168–80.
25. Bojko B, Wąsowicz M, Pawliszyn J. Metabolic profiling of plasma from cardiac surgical patients concurrently administered with tranexamic acid: DI-SPME-LC-MS analysis. *J Pharm Anal*. 2014;4(1):6–13.
26. Bessonneau V, Bojko B, Pawliszyn J. Analysis of human saliva metabolome by direct immersion solid-phase microextraction LC and benchtop orbitrap MS. *Bioanalysis*. 2013;5(7):783–92.
27. Silva CL, Passos M, Câmara JS. Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers--a powerful strategy for breast cancer diagnosis. *Talanta*. 2012;89:360–8.
28. Silva CL, Passos M, Câmara JS. Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry. *Br J Cancer*. 2011;105(12):1894–904.

29. Rykowska I, Wasiak W. Advances in stir bar sorptive extraction coating: A review. *Acta Chromatogr.* 2013;25(1):27–46.
30. Huang X, Yuan D, Huang B. Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. *Talanta.* 2008;75(1):172–7.
31. Xu Z, Song C, Hu Y, Li G. Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drug sin complex samples. *Talanta.* 2011;85:97-103.
32. Lambert J-P, Mullett WM, Kwong E, Lubda D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. *J Chromatogr A.* 2005;1075(1–2):43–9.
33. Melo LP, Nogueira AM, Lancas FM, Queiroz MEC. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. *Anal Chim Acta.* 2009;63:57-64.
34. Jiang R, Pawliszyn J. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *Trends Analyt Chem.* 2012;39:245–53.
35. Bessonneau V, Boyaci E, Maciazek-Jurczyk M, Pawliszyn J. In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring. *Anal Chim Acta.* 2015;856:35–45.
36. Riazanskaia S, Blackburn G, Harker M, Taylor D, Thomas CLP. The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for in-vivo sampling of volatile organic compounds in and on human skin. *Analyst.* 2008;133(8):1020–7.
37. Thomas AN, Riazanskaia S, Cheung W, Xu Y, Goodacre R, Thomas CLP, et al. Novel noninvasive identification of biomarkers by analytical profiling of chronic wounds using



- volatile organic compounds: Novel noninvasive analysis of chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2010;18(4):391–400.
38. Fernández-Amado M, Prieto-Blanco MC, López-Mahía P, Muniategui-Lorenzo S, Prada-Rodríguez D. Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review. *Anal Chim Acta.* 2016;906:41–57.
39. Yasuhara R, Ehara K, Saito K, Kataoka H. Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Methods.* 2012;4(11):3625.
40. Kataoka H, Ehara K, Yasuhara R, Saito K. Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405(1):331–40.
41. Saito K, Yagi K, Ishizaki A, Kataoka H. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;52(5):727–33.
42. Ahmadi SH, Manbohi A, Heydar KT. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction. *Anal Chim Acta.* 2015;853:335–41.
43. Ahmadi SH, Manbohi A, Heydar KT. Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of naproxen from urine samples using an experimental design. *Analyst.* 2015;140(2):497–505.
44. Yu Q-W, Wang X, Ma Q, Yuan B-F, He H-B, Feng Y-Q. Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry

- based on a poly(4-vinylpyridine-co-ethylene dimethacrylate) monolith. *Anal Methods*. 2012;4(6):1538.
45. Caris JA, Silva BJG, Moisés ECD, Lanchote VL, Queiroz MEC. Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study: Sample Preparation. *J Sep Sci*. 2012;35(5–6):734–41.
46. Melo LP, Queiroz RHC, Queiroz MEC. Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2011;879(24):2454–8.
47. Alves G, Rodrigues M, Fortuna A, Falcão A, Queiroz J. A critical review of microextraction by packed sorbent as a sample preparation approach in drug bioanalysis. *Bioanalysis*. 2013;5(11):1409–42.
48. Overholser BR, Foster DR. Opioid pharmacokinetic drug-drug interactions. *Am J Manag Care*. 2011;17 Suppl 11:S276-87.
49. Saracino MA, Marcheselli C, Somaini L, Pieri MC, Gerra G, Ferranti A, et al. A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone. *Anal Bioanal Chem*. 2012;404(2):503–11.
50. Somaini L, Saracino MA, Marcheselli C, Zanchini S, Gerra G, Raggi MA. Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients. *Anal Chim Acta*. 2011;702(2):280–7.
51. Saracino MA, Tallarico K, Raggi MA. Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure. *Anal Chim Acta*. 2010;661(2):222–8.

52. Rani S, Malik AK. A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine: Sample Preparation. *J Sep Sci.* 2012;35(21):2970–7.
53. Rani S, Malik AK, Singh B. Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine. *J Sep Sci.* 2012;35(3):359–66.
54. Abdel-Rehim M, Hassan Z, Skanssem P, Hassan M. Simultaneous determination of busulphan in plasma samples by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry utilizing microextraction in packed syringe (MEPS) as on-line sample preparation method. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2007;30(20):3029–41.
55. Said R, Hassan Z, Hassan M, Abdel-Rehim M. Rapid and sensitive method for determination of cyclophosphamide in patients plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS). *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2008;31(5):683–94.
56. Vlčková H, Solichová D, Bláha M, Solich P, Nováková L. Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples--critical evaluation. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(2):301–8.
57. Vlčková H, Rabatinová M, Mikšová A, Kolouchová G, Mičuda S, Solich P, et al. Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC-MS/MS and microextraction by packed sorbent. *Talanta.* 2012;90:22–9.
58. Xie W, Mullett WM, Miller-Stein CM, Pawliszyn J. Automation of in-tip solid-phase microextraction in 96-well format for the determination of a model drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009;877(4):415–20.

59. Barroso M, Gallardo E, Queiroz JA. The role of liquid-phase microextraction techniques in bioanalysis. *Bioanalysis*. 2015;7(17):2195–201.
60. He Y, Kang Y-J. Single drop liquid-liquid-liquid microextraction of methamphetamine and amphetamine in urine. *J Chromatogr A*. 2006;1133(1–2):35–40.
61. Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Gholizade A, Sedighi A, Kasraee S. Determination of fentanyl in biological and water samples using single-drop liquid-liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Anal Chim Acta*. 2008;626(2):193–9.
62. Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A. Developments in hollow fiber based liquid-phase microextraction: principles and applications. *Mikrochim Acta*. 2012;177(3–4):271–94.
63. Liu W, Zhang L, Wei Z, Chen S, Chen G. Analysis of beta-agonists and beta-blockers in urine using hollow fibre-protected liquid-phase microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography/mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2009;1216(28):5340–6.
64. Ghambarian M, Yamini Y, Esrafil A. Three-phase hollow fiber liquid-phase microextraction based on two immiscible organic solvents for determination of tramadol in urine and plasma samples. *J Pharm Biomed Anal*. 2011;56(5):1041–5.
65. Yang Y, Chen J, Shi Y-P. Determination of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in urine using hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(28):2811–6.
66. Lili L, Xu H, Song D, Cui Y, Hu S, Zhang G. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on

solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*. 2010;1217(16):2365–70.

## 7. ŽIVOTOPIS