

Metody izolacji leków i ich metabolitów z matrycy biologicznej stosowane w badaniach farmakokinetycznych

Franciszek Główka, Marta Karaźniewicz-Łada

Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Adres do korespondencji: Franciszek Główka, Katedra i Zakład Farmacji Fizycznej i Farmakokinetyki, ul. Święcickiego 6, 60-781 Poznań, tel.: 061 854 64 37, faks: 061 854 64 30, glowka@ump.edu.pl

Z czego wynika potrzeba izolacji leków z materiału biologicznego?

Badania farmakokinetyki leków przeprowadza się najczęściej na podstawie oznaczenia całkowitego stężenia leku w matrycy biologicznej (krew, surowica, osocze, mocz, płyn stawowy czy ślina), podczas gdy o efekcie terapeutycznym decyduje frakcja niezwiązana. Takie postępowanie jest spowodowane głównie trudnościami technicznymi oznaczenia tak bardzo niskich poziomów frakcji niezwiązanej leku, jak również z problemem ilościowego rozdzielania leków, które są zazwyczaj związkami o małej masie cząsteczkowej, od związków wielkocząsteczkowych, takich jak białka. Często oznaczanie nawet całkowitego stężenia leku macierzystego w płynach biologicznych sprawia analitykowi duże trudności ze względu na jego niskie poziomy w badanych płynach ustrojowych. To z kolei najczęściej jest wynikiem podawania obecnie małych, miligramowych dawek leku. Problem oznaczalności komplikuje też zmniejszona dostępność biologiczna substancji czynnej z postaci leku, dodatkowo potęgowana efektem pierwszego przejścia. Bardzo szybka eliminacja analitu z ustroju, przy wolnej jego absorpcji powoduje, że w organizmie występują małe poziomy. Zatem izolacja analitu, jak i jego dalsze zatężanie, służy zwiększeniu oznaczalności metody, co z kolei przekłada się na uzyskanie prawidłowego modelu farmakokinetycznego leku czy też metabolitu. Szybki metabolizm niektórych leków sprawia, że oznacza się też poziomy aktywnych lub nieaktywnych biologicznie metabolitów, jak to jest w przypadku klopidogrelu.

Badania farmakokinetyki leków, jak i ich metabolitów, przeprowadza się z użyciem odpowiednio

Methods of isolation of drugs and their metabolites from biological matrix applied in pharmacokinetic studies

Pharmacokinetic studies of drugs, defined as Therapeutic Drug Monitoring, are based on determination of the total drug concentrations following its isolation from biological matrix. The aim of the isolation of a parent drug or its metabolites from biological fluids is an appropriate preparation of the samples, in which the drug levels are determined by validated analytical methods, such as HPLC, GC or HPCE. Due to complexity of a biological matrix and different physicochemical properties of drugs, a selection of a suitable method for drug isolation from biological fluids is of great importance. The paper presents various methods for isolation of drugs from biological materials. The methods are based on different interactions between analyte and sorbent or organic solvent used in extraction process. Apart from classical methods: liquid-liquid extraction and solid phase extraction, many other techniques are presented, such as solid phase microextraction or supercritical fluid extraction, which are applied to pharmacokinetic studies more and more often.

Keywords: biological material, extraction, partition coefficient, eluotropic series, adsorbents.

© Farm Pol, 2009, 65(7): 505-510

czułych i selektywnych metod analitycznych. Najczęściej stosuje się w tym celu wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC), chromatografię gazową (GC) czy wysokosprawną elektroforezę kapilarną (HPCE), stąd bardzo ważne jest właściwe przygotowanie próbek pobranych od pacjenta do oznaczeń. Ze względu na złożony charakter materiału biologicznego, konieczne jest oddzielenie analizowanych związków od substancji endogennych pochodzących z matrycy

Badania farmakokinetyki leków przeprowadza się najczęściej na podstawie oznaczenia całkowitego stężenia leku w matrycy biologicznej (krew, surowica, osocze, mocz, płyn stawowy czy ślina), podczas gdy o efekcie terapeutycznym decyduje frakcja niezwiązana.

oraz od innych leków przyjmowanych przez pacjentów, które mogłyby zakłócać wynik oznaczeń. Ponadto procedura przygotowania próbek obejmuje, obok izolacji analitów z materiału biologicznego, często także ich derywatyzację w celu zwiększenia oznaczalności. Przeprowadzenie w odpowiedniej pochodnej, o większej niż związek macierzysty zdolności do fluorescencji czy absorpcji promieniowania UV, jest szczególnie ważne w przypadku konieczności oznaczania małych poziomów leku w organizmie. Ze względu na fakt, że derywatywacji mogą ulegać również związki endogenne i inne leki o strukturze podobnej do analizowanych substancji, konieczna jest nie tylko selektywna izolacja substancji leczniczej i jej metabolitów z matrycy biologicznych przed derywatyzacją, lecz często także oddzielenie utworzonych pochodnych analitów od innych produktów derywatywacji, mogących interferować z oznaczanymi związkami [1].

Walidacja metod analitycznych

Konieczność selektywnej izolacji substancji macierzystej i/lub jej metabolitów z materiału biologicznego jest bezpośrednio związana z dalszą procedurą analityczną, która ma na celu ilościowe oznaczenie wyodrębnionych analitów. Zgodnie z wytycznymi The European Medicines Agency (EMA) oraz Food and Drug Administration (FDA), metody analityczne stosowane do oznaczania związków macierzystych i produktów ich biotransformacji w surowicy, osoczu, krwi, moczu czy innych płynach biologicznych, powinny być poddane walidacji, której celem jest potwierdzenie wiarygodności tych oznaczeń. Walidacja metod powinna obejmować: określenie precyzji i dokładności oznaczeń, selektywności i czułości metody, powtarzalności oznaczeń, wydajności ekstrakcji analitów z materiału biologicznego oraz trwałości roztworów wzorcowych i trwałości analitów w płynach biologicznych w warunkach przechowywania oraz przygotowania próbek do oznaczeń [2, 3]. Selektowność określa możliwość oznaczenia daną metodą analityczną badanych związków w obecności innych substancji zawartych w próbce, takich jak związki endogenne, metabolity, produkty transformacji analitów, oraz inne leki przyjmowane przez pacjenta. Stąd tak ważne jest selektywne wyizolowanie analitu z matrycy biologicznej. Precyzja określa stopień zgodności między pojedynczymi wynikami analizy (rozzrut wyników). Jej miarą jest współczynnik zmienności ($Wz\%$), określony wzorem $(SD/\bar{x} \times 100\%)$, którego wartość nie powinna przekraczać 15% dla wszystkich stężeń z wyjątkiem najniższego stężenia z krzywej wzorcowej, dla

którego $Wz \leq 20\%$. Z pojęciem precyzji metody związana jest powtarzalność i odtwarzalność metody, czyli możliwość uzyskiwania takich samych wyników w różnych odstępach czasowych nie tylko przez danego analityka, lecz również w innych laboratoriach badawczych. Dokładność określa zgodność uzyskanych wyników (C_{sr}) z wartością rzeczywistą (C_{rz}). Miarą dokładności może być wielkość błędu oznaczeń, określona wzorem $(C_{sr} - C_{rz})/C_{rz} \times 100\%$, którego wartość, podobnie jak w przypadku precyzji, nie powinna przekraczać 15% dla wszystkich stężeń oraz 20% dla najniższego stężenia z krzywej wzorcowej. Badanie odzysku prowadzone jest w celu stwierdzenia ewentualnych strat analitu w toku analizy oraz wpływu matrycy na wynik badania. Polega ono na porównaniu wyników analizy badanej substancji, po jej ekstrakcji z płynów biologicznych, w stosunku do wartości uzyskanych dla substancji nieekstrahowanej. Obecnie nie ma określonych wymagań dotyczących wartości odzysku, jednakże przyjmuje się, że postępowanie analityczne stosowane do wyodrębnienia analitu z matrycy powinno umożliwić oznaczenie odpowiednio niskich stężeń w próbkach biologicznych [2, 3].

Metody izolacji leków i ich metabolitów z matrycy biologicznej

Wyizolowanie substancji leczniczej i/lub jej metabolitów z materiału biologicznego pobranego od pacjenta jest prawdziwym wyzwaniem dla analityka. Jest to związane z faktem, że krew, ślina, a zwłaszcza mocz są bardzo złożonymi matrycami, zawierającymi w swoim składzie białka, sole, kwasy, zasady, a także związki organiczne, które często mają podobną budowę chemiczną do analizowanych substancji. Ponadto w przypadku takich związków jak steroidy czy benzodiazepiny często występują oddziaływania kwasowo-zasadowe, czy też oddziaływania pomiędzy ich grupami funkcyjnymi, które wpływają na rozpuszczalność analitów oraz na zmniejszone powinowactwo do sorbentów stosowanych w ekstrakcji. Wybór odpowiedniej metody izolacji związków macierzystych i ich metabolitów z materiału biologicznego uzależniony jest od właściwości fizykochemicznych badanych substancji, a zwłaszcza od ich polarności, a także od rodzaju materiału biologicznego, z którego lek ma być wyodrębniony.

Ekstrakcja ciecz-ciecz

Ekstrakcja klasyczna ciecz-ciecz jest od wielu lat najpowszechniej stosowaną metodą ekstrakcji analitów z płynów biologicznych. Polega ona na dodaniu do próbki o charakterze hydrofilowym (osocze, surowica, mocz, ślina, płyn stawowy) odpowiednich ilości rozpuszczalnika organicznego. Analit ulega ekstrakcji zgodnie z prawem podziału Nernsta. Według prawa Nernsta stosunek stężeń substancji rozpuszczonej

w dwóch niemieszających się ze sobą fazach ciekłych (rozpuszczalnik organiczny i woda) jest w stanie równowagi wielkością stałą, niezależną od ilości substancji i ilości użytych faz.

$$K = \frac{C_o}{C_w}$$

gdzie c_o i c_w – stężenia substancji w fazie organicznej i fazie wodnej, K – współczynnik podziału.

Powyższe prawo jest spełnione tylko wtedy, gdy temperatura układu jest stała, fazy ciekłe nie mieszają się ze sobą, roztwory substancji rozpuszczonej w obu fazach są roztworami rozcieńczonymi, a substancja rozpuszczona nie ulega dysocjacji i asocjacji w cieczach. Jeżeli z objętości V_1 próbki o charakterze hydrofilowym chcemy wyodrębnić m gramów badanej substancji za pomocą objętości V_2 rozpuszczalnika organicznego, współczynnik podziału można wyrazić wzorem:

$$K = \frac{m_1/V_1}{(m-m_1)/V_2}$$

gdzie m_1 – masa substancji, która pozostaje w próbce hydrofilowej po ekstrakcji.

Stąd

$$m_1 = m \frac{KV_1}{KV_1+V_2}$$

Jeśli proces ekstrakcji powtórzymy n -krotnie, to w warstwie wodnej pozostanie m_n gramów substancji:

$$m_n = m \left(\frac{KV_1}{KV_1+V_2} \right)^n$$

Z przedstawionego równania wynika, że wartość m_n będzie mała, kiedy liczba n będzie duża, a wartość V_2 mała, czyli proces ekstrakcji będzie bardziej wydajny, jeśli prowadzi się go kilkakrotnie małymi porcjami rozpuszczalnika [4].

Rozpuszczalnik organiczny, ze względu na niską temperaturę wrzenia może być łatwo usunięty przez odparowanie, co prowadzi również do zwiększenia stężenia analitu. Ma to szczególne znaczenie w przypadku takich związków, których poziomy w płynach biologicznych są bardzo małe. Z rozpuszczalników organicznych najczęściej stosuje się dichlorometan, eter dietylowy, heksan, chloroform oraz mieszaniny tych rozpuszczalników. Wadą tej metody jest fakt, że do ekstrakcji nie można używać rozpuszczalników polarnych mieszających się z wodą. Z tego względu metoda ta nadaje się jedynie do ekstrakcji związków niepolarnych, które rozpuszczają się w rozpuszczalnikach organicznych. Ekstrakcja ciecz-ciecz znalazła zastosowanie w badaniach farmakokinetyki enancjomerów niesteroidowych leków przeciwzapalnych pochodnych kwasu 2-arylopropionowego (ibuprofen, flurbiprofen, ketoprofen) i 2-arylobutanowego (indobufen) u zdrowych ochotników [5–7]. Do izolacji tych związków z małych objętości surowicy i osocza (0,5–1 ml), po uprzednim doprowadzeniu próbki do

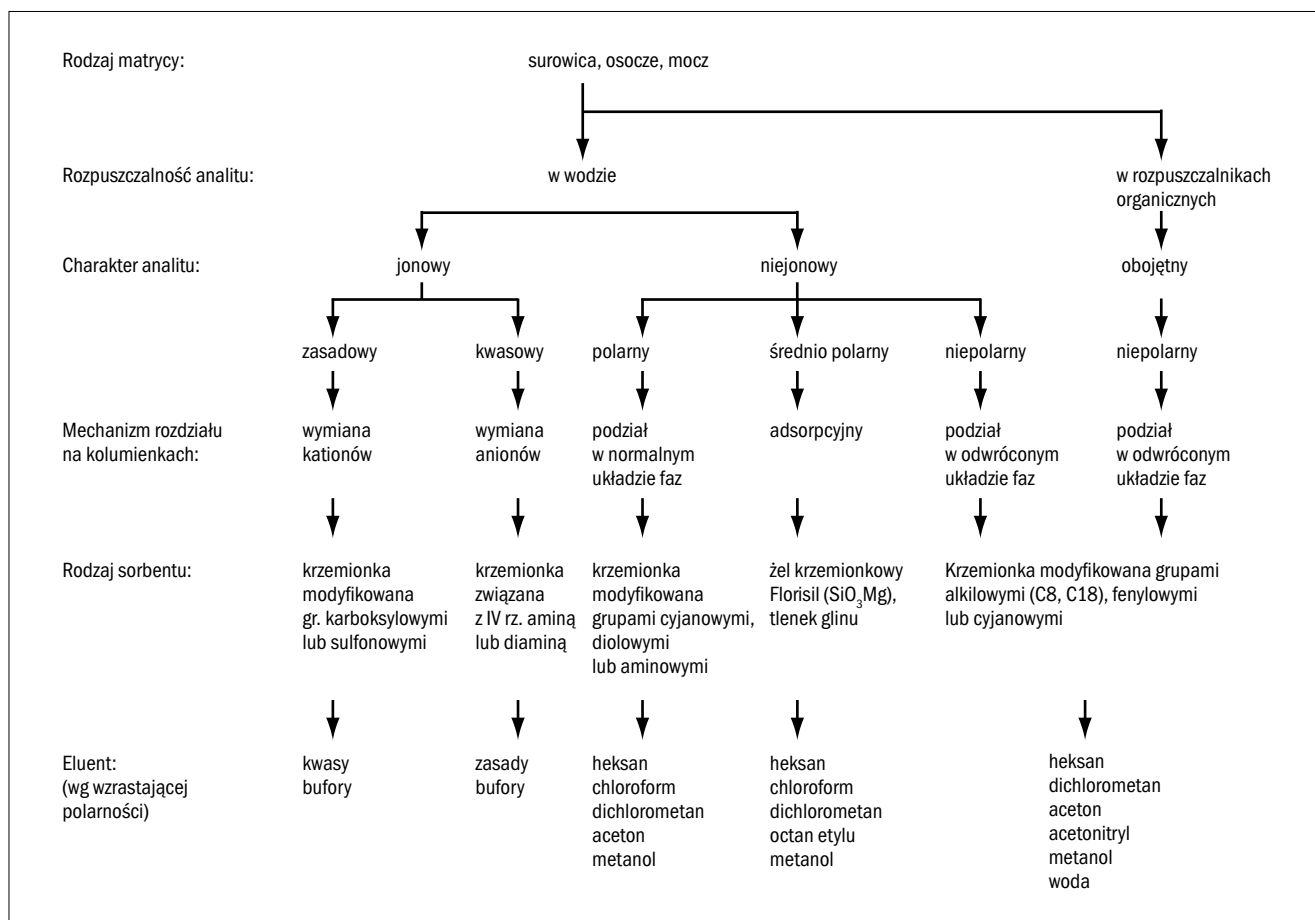
Tabela 1. Szereg eluotropowy rozpuszczalników dla adsorbentów polarnych: SiO_2 i Al_2O_3

	Eluent*	Siła elucji ϵ_s	
		SiO_2	Al_2O_3
najmniej polarny	n-Pentan	0,00	0,00
	n-Heksan	0,03	0,01
	Cykloheksan	0,03	0,04
	Tetra-chlorek węgla	0,11	0,18
	Eter diizopropylowy	0,21	0,28
	Benzen	0,25	0,32
	Chloroform	0,26	0,40
	Dichlorometan	0,32	0,42
	Eter dietylowy	0,38	0,38
	Octan etylu	0,38	0,58
	Aceton	0,47	0,56
	Dioksane	0,49	0,56
	Acetonitryl	0,50	0,65
	Pirydyna	–	0,71
	n-Propanol	0,63	0,82
	Etanol	0,69	0,88
najbardziej polarny	Metanol	0,73	0,95

* Zdolność elucji analitów z kolumny wypełnionej niepolarną fazą stacjonarną, np. C_{18} w odwróconym układzie faz (Reversed Phase), będzie odwrotna

pH kwasowego za pomocą kwasu orto-fosforowego, zastosowano dichlorometan, uzyskując dużą wydajność ekstrakcji, powyżej 85%. Wybór odpowiedniego rozpuszczalnika, jak i jego ilość ma istotne znaczenie w przypadku ekstrakcji leków z płynów biologicznych. Przykładowo, odzysk enancjomerów ibuprofenu z 1 ml osocza przy użyciu 2 ml heksanu był niższy w porównaniu do dichlorometanu użytego w takiej samej objętości i wynosił jedynie 40%. Indobufen praktycznie nie ulegał ekstrakcji do heksanu [7]. Natomiast, stosując mieszaninę heksan: eter dietylowy (80:20) o objętości 5 ml do ekstrakcji enancjomerów ibuprofenu z 0,5 ml osocza, wydajność ekstrakcji wynosiła 80% [8]. Ekstrakcję ciecz-ciecz zastosowano również do izolacji enancjomerów ketoprofenu z osocza, moczu, a w szczególności płynu stawowego chorych na reumatoidalne zapalenie stawów. Próbki doprowadzone do pH kwasowego ekstrahowano za pomocą dichlorometanu, uzyskując dużą wydajność ekstrakcji wynoszącą 76% dla osocza, 88% dla płynu stawowego i 92% dla moczu [9]. Skuteczność izolacji analitów z materiału biologicznego za pomocą dichlorometanu potwierdzono również w badaniach farmakokinetyki (+)-S-naproksenu w surowicy i ślinie u ludzi, uzyskując dużą wydajność ekstrakcji rzędu 83–91% [10]. Pomimo prostoty oraz udowodnionej skuteczności

Z rozpuszczalników organicznych najczęściej stosuje się dichlorometan, eter dietylowy, heksan, chloroform oraz mieszaniny tych rozpuszczalników. Wadą tej metody jest fakt, że do ekstrakcji nie można używać rozpuszczalników polarnych mieszających się z wodą.



Ryc. 1. Kryteria doboru adsorbentów i eluentów do ekstrakcji substancji leczniczych z materiału biologicznego metodą SPE

klasycznej ekstrakcji ciecz-ciecz, obecnie istnieje tendencja do stosowania innych metod izolacji związków z materiału biologicznego. Jest to związane z koniecznością ograniczenia stosowania rozpuszczalników organicznych, które mogą być szkodliwe dla ludzi i dla środowiska. Ponadto, złożony charakter matrycy biologicznej, czy obecność innych leków przyjmowanych przez chorych wymaga często zastosowania bardziej selektywnych metod izolacji.

Ekstrakcja do ciała stałego

Metoda ekstrakcji do ciała stałego (SPE) spełnia powyższe warunki. Do izolacji substancji leczniczych i ich metabolitów z matrycy biologicznych wykorzystuje się zmodyfikowane powierzchniowo materiały krzemionkowe i polimerowe, podobne do tych, które są szeroko stosowane w HPLC. Próbkę materiału biologicznego, doprowadzone do odpowiedniego pH, nanosi się na kolumnkę z adsorbentem, uprzednio aktywowane za pomocą określonych rozpuszczalników, np: metanol, woda. Ekstrakcja analitu do fazy stałej zachodzi wówczas, gdy wiązanie między adsorbentem a analitem jest silniejsze, niż między analitem a matrycą biologiczną. Wybór wypełnienia kolumnki uzależniony jest od właściwości analitu (rycina 1). Do najczęściej używanych adsorbentów

należą: żel krzemionkowy, tlenek glinowy, krzemionka modyfikowana grupami alkilowymi (np. C-8, C-18), fenyłowymi, cyjanowymi, a także fazy stacjonarne stosowane w chromatografii jonowymiennej. Zasada rozdziału metodą SPE zależy głównie od natury adsorbentu. Siłami warunkującymi oddziaływanie między analitem a adsorbentem polarnym (np. krzemionka modyfikowana grupami diolowymi lub aminowymi) są wiązania wodorowe, oddziaływanie dipol-dipol oraz dipol indukowany-dipol. Gdy zastosowanym sorbentem jest krzemionka z chemicznie związaną grupą niepolarną, np. oktadecylową (odwrócony układ faz), oddziaływanie między analitem a adsorbentem zachodzą na zasadzie sił dyspersyjnych (van der Waals). W przypadku analitów jonowych, oddziaływanie z adsorbentem odbywają się na zasadzie elektrostatycznego przyciągania grup funkcyjnych [11]. Analizy związane z wypełnieniem można odzyskiwać poprzez ekstrakcję rozpuszczalnikami organicznymi (rycina 1). W procesie wymywania eluent musi posiadać silniejsze powinowactwo do analitu niż sorbent. Zdolność rozpuszczalnika do wymywania substancji z adsorbentu zależy od jego siły oddziaływania z powierzchnią wypełnienia kolumnki i zwana jest mocą elucyjną rozpuszczalnika. Siła ta wzrasta wraz z polarnością rozpuszczalnika. W celu

doboru odpowiedniego rozpuszczalnika ułożono je w szeregi eluotropowe. Moc elucji rozpuszczalników dla adsorbentów polarnych takich jak żel krzemionkowy czy tlenku glinu przedstawia się następująco: kwas octowy > woda > metanol > acetonitryl > aceton > dichlorometan > eter etylowy > chloroform > n-heksan [11]. Bardziej szczegółową charakterystykę rozpuszczalników szeregu eluotropowego przedstawiono w **tabeli 1** [12].

Izolacja analitów z płynów biologicznych metodą SPE znalazła szerokie zastosowanie w badaniach farmakokinetyki wielu substancji leczniczych i ich metabolitów. Jest to związane nie tylko z mniejszym zużyciem odczynników chemicznych i możliwością wielokrotnego użycia sorbentu, lecz także z wysoką wydajnością ekstrakcji i odtwarzalnością wyników. Metodę SPE, przy użyciu kolumniek wypełnionych krzemionką związaną z fazą C18, wykorzystano do izolacji enancjomerów ibuprofenu z osocza i moczu zdrowych ochotników [7]. Metoda ta okazała się odpowiednia również dla chiralnych metabolitów hydroksylowych i karboksylowych ibuprofenu, mimo że charakteryzują się one większą polarnością w stosunku do leku macierzystego [13]. Pewnym ograniczeniem uniemożliwiającym zastosowanie SPE może być sam materiał biologiczny. Próba ekstrakcji metodą SPE enancjomerów ketoprofenu z małych objętości (0,5 ml) płynu stawowego chorych z reumatoidalnym zapaleniem stawów nie powiodła się, ze względu na dużą lepkość płynu stawowego i obecność związków wielkocząsteczkowych, które zamykały pory wypełnienia kolumniek, mimo rozcieńczenia próbki [9].

Izolacja leków o charakterze polarnym

Do izolacji leków o charakterze hydrofilowym z próbek biologicznych stosuje się metodę SPE z krzemionką modyfikowaną m.in. grupami cyjanowymi, diolowymi czy aminowymi, a także tlenek glinu i Florisil (SiO_2/Mg) (**rycina 1**). Jednakże, w przypadku leków polarnych, których poziomy w płynach biologicznych są duże, bardzo często przygotowanie próbek do oznaczeń sprowadza się jedynie do oddzielenia małych cząsteczkowych substancji leczniczych od związków wielkocząsteczkowych, głównie białek, poprzez ich strącenie rozpuszczalnikiem organicznym lub zastosowanie odpowiednich filtrów. W badaniach farmakokinetycznych kwasu mykofenolowego u chorych po przeszczepieniu nerki, procedura przygotowania próbek osocza do oznaczeń metodą HPLC obejmowała strącenie białek osocza za pomocą acetonitrylu. Następnie po pobraniu supernatantu, odparowywano rozpuszczalnik organiczny w łagodnym przepływie azotu, a suchą pozostałość po rozpuszczeniu w fazie ruchomej nastrzykiwano na kolumnę [14]. Do strącenia białka, oprócz acetonitrylu, używa się również innych rozpuszczalników, takich jak metanol, etanol czy kwas trichlorooctowy. W przypadku treosulfanu,

leku stosowanego w terapii mieloablacyjnej u dzieci przed przeszczepem komórek hematopoetycznych, procedura przygotowania próbek osocza do analizy obejmowała mikrosączenie w zestawie do ultrafiltracji. Pozwoliło to oddzielić analit od białek i innych związków o masie większej niż 10 kDa. Uzyskany przesącz był bezpośrednio nastrzykiwany na kolumnę do HPLC. Natomiast w przypadku próbek moczu wystarczające było rozcieńczenie próbki przed analizą. Przedstawiona procedura umożliwiała oznaczenie z odpowiednią precyzją i dokładnością takich poziomów treosulfanu w osoczu i moczu, które pozwoliły na uzyskanie odpowiedniego profilu farmakokinetycznego leku. Ponadto, nie stwierdzono interferencji ze strony związków pochodzących z matrycy, czy też innych leków przyjmowanych przez chorych [15]. Należy zauważyć, że do oznaczeń wykorzystywano detektor refraktometryczny charakteryzujący się mniejszą czułością niż detektor UV czy fluorescencyjny, stąd opisaną procedurę przygotowania próbek należy ocenić ponownie w przypadku stosowania detektorów o większej czułości.

Inne metody ekstrakcji

Opublikowano kilka innych metod izolacji leków z materiału biologicznego, charakteryzujących się mniejszym zużyciem rozpuszczalników, skróceniem czasu ekstrakcji, wysoką selektywnością i łatwością automatyzacji. Należy do nich ekstrakcja cieczą w stanie nadkrytycznym (SFE, Supercritical Fluid Extraction), czyli cieczą powyżej krytycznej temperatury i ciśnienia. W tej metodzie ciecze używane do izolacji analitów z matrycy wykazują małą lepkość i napięcie powierzchniowe oraz charakterystyczną dla gazów zdolność do przenikania próbki, dzięki czemu umożliwiają bardziej efektywną penetrację matrycy. Najczęściej stosuje się dwutlenek węgla w stanie nadkrytycznym, ponieważ jest stosunkowo bezpieczny i chemicznie obojętny. Wykorzystywany jest on do ekstrakcji niepolarnych i średniopólnych analitów, np.: steroidów z płynów ustrojowych i tkanek [16]. Ponadto do izolacji substancji leczniczych, m.in. barbituranów z próbek biologicznych, używa się przyspieszonej ekstrakcji za pomocą rozpuszczalnika (ACE, Accelerated Solvent Extraction). W metodzie tej wykorzystuje się takie same rozpuszczalniki jak w metodach klasycznych, lecz pod zwiększonym ciśnieniem tj. około 10–14 MPa i podwyższonej temperaturze rzędu 50–200°C. Zaletą metody jest lepsza penetracja próbki przez rozpuszczalnik oraz skrócenie czasu ekstrakcji [17]. Do izolacji substancji leczniczych z płynów biologicznych używa się również ekstrakcji wspomagananej promieniowaniem

Selektywność określa możliwość oznaczenia daną metodą analityczną badanych związków w obecności innych substancji zawartych w próbce, takich jak związki endogenne, metabolity, produkty transformacji analitów, oraz inne leki przyjmowane przez pacjenta.

Do izolacji substancji leczniczych z płynów biologicznych używa się również ekstrakcji wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym (MAE, Microwave-Assisted Extraction). W metodzie tej próbka z rozpuszczalnikiem używanym do ekstrakcji poddawana jest działaniu fal elektromagnetycznych o dużej częstotliwości, dzięki czemu uzyskuje się znaczne skrócenie czasu ekstrakcji oraz mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych.

mikrofalowym (MAE, Microwave-Assisted Extraction). W metodzie tej próbka z rozpuszczalnikiem używanym do ekstrakcji poddawana jest działaniu fal elektromagnetycznych o dużej częstotliwości, dzięki czemu uzyskuje się znaczne skrócenie czasu ekstrakcji oraz mniejsze zużycie rozpuszczalników organicznych. MAE stosowano do izolacji m.in. lidokainy, morfiny, diazepamu z surowicy, osocza, śliny i moczu [18]. Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME, Solid Phase Microextraction) jest nowoczesną metodą przygotowania próbki do analizy chromatograficznej, opartą na SPE. Sorbent, najczęściej polidimetylosiloksan (PDMS), poliakryl (PA) i ich mieszaniny, nanoszony jest na cienkie włókno szklane lub kwarcowe, które umieszcza się w igle specjalnej strzykawki. Proces ekstrakcji składa się z absorpcji lub adsorpcji analitów z próbki do pokrycia włókna, a następnie desorpcji w komorze nastrzykowej chromatografu. Metoda ta znajduje coraz szersze zastosowanie do izolacji różnych grup substancji leczniczych z próbek biologicznych, m.in. anestetyków, barbituranów, steroidów, co związane jest z krótkim czasem ekstrakcji, bardzo małym zużyciem rozpuszczalników organicznych oraz możliwością automatyzacji procesu [19].

Podsumowanie

Wybór odpowiedniej metody izolacji substancji leczniczej i/lub jej metabolitów z próbek biologicznych pobranych od pacjenta odgrywa kluczową rolę w badaniach farmakokinetycznych. Jest to związane z koniecznością dokładnego i precyzyjnego oznaczenia poziomów wyizolowanych analitów, co w konsekwencji ma wpływ na dalszą farmakoterapię. Mimo że w dalszym ciągu powszechnie stosuje się klasyczne metody ekstrakcji ciecz-ciecz oraz SPE, coraz częściej wykorzystuje się inne metody izolacji, takie jak SFE, MAE czy SPME, umożliwiające oszczędność odczynników chemicznych oraz skrócenie czasu przygotowywania próbek do analizy.

Otrzymano: 2009.05.02 · Zaakceptowano: 2009.05.15

Piśmiennictwo

1. Głowska F.K., Karaźniewicz M., Lipnicka E.: RP - HPLC method with fluorescence detection for determination of low quantities of triamcinolone in plasma in presence of endogenous steroids after derivatization with 9-anthroyl nitrile; pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B* 2006, 839, 54-61.
2. Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence (2001). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Evaluation of Medicines for Human Use. http://healthtech.who.int/pq/info_applicants/BE/emea_bioequiv.pdf (stan z 30.04.2009).
3. Guidance for Industry. Bioanalytical method validation. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. www.fda.gov/cder/Guidance/6983fml.pdf (stan z 30.04.2009).
4. Hermann T.: *Chemia fizyczna. Podręcznik dla studentów farmacji i analityki medycznej*. Wyd. 1. Warszawa: Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2008.
5. Głowska F.K., Karaźniewicz M.: High performance capillary electrophoresis for determination of the enantiomers of 2-arylpropionic acid derivatives in human serum. *Pharmacokinetic studies of ketoprofen enantiomers following administration of standard and sustained release tablets*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 35, 807-816.
6. Głowska F., Karaźniewicz M.: Resolution of indobufen enantiomers by capillary zone electrophoresis. *Pharmacokinetic studies of human serum*. *J. Chromatogr. A* 2004, 1032, 219-225.
7. Głowska F., Karaźniewicz M.: High performance capillary electrophoresis method for determination of ibuprofen enantiomers in human serum and urine. *Anal. Chim. Acta* 2005, 540, 95-102.
8. Głowska F.K.: HPLC methodology for determination of ibuprofen enantiomers to be used in pharmacokinetics. *Chem. Anal.* 1998, 43, 79-84.
9. Głowska F.K., Karaźniewicz Łada M.: CE determination of ketoprofen enantiomers in clinical samples of plasma, synovial fluid and urine. *Chromatographia* 2008, 67, S97-S105.
10. Głowska F.K., Dorawska A.: Farmakokinetyka całkowitego stężenia i frakcji wolnej (+)-S-naproksenu w surowicy i ślinie u ludzi. *Postępy Farmakoterapii* 2002, 3, 24-30.
11. Guide to Solid Phase Extraction. Supelco. Bulletin 910. www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf (stan z 30.04.2009).
12. TLC Book. www.namedorganicreactions.co.uk/examptlcl.pdf (stan z 30.04.2009).
13. Głowska F.K., Karaźniewicz M.: Enantioselective CE method for pharmacokinetic studies on ibuprofen and its chiral metabolites with reference to genetic polymorphism. *Electrophoresis* 2007, 28, 2726-2737.
14. Graj J., Chrzanowska M.: Walidacja metody HPLC analizy ilościowej kwasu mykofenolowego z przeznaczeniem do terapeutycznego monitorowania u pacjentów po przeszczepieniu nerki. *Probl. Ter. Monit.* 2006, 17, 3-10.
15. Głowska F.K., Karaźniewicz Łada M., Grund G., Wachowiak J.: Determination of treosulfan in plasma and urine by HPLC with refractometric detection; pharmacokinetic studies in children undergoing myeloablative treatment prior to haematopoietic stem cell transplantation. *J. Chromatogr. B* 2007, 850, 569-574.
16. Kureckova K., Maralíkova B., Ventura K.: Supercritical fluid extraction of steroids from biological samples and first experience with solid-phase microextraction-liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 83-89.
17. Zhao H., Wang L., Qiu Y., Zhou Z., Li X., Zhong W.: Simultaneous determination of three residual barbiturates in pork using accelerated solvent extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 2006, 840, 139-145.
18. Madej K.: Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. *Trends in Analytical Chemistry* 2009, 28, 436-446.
19. Snow N.H.: Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J. Chromatogr. B* 2000, 885, 445-455.