



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

SPOJENÍ MIKRO-ELEKTROMEMBRÁNOVÉ EXTRAKCE S TRANSIENTNÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZOU PRO ANALÝZU LÉČIV V BIOLOGICKÝCH VZORCÍCH

COUPLING OF MICRO-ELECTROMEMBRANE EXTRACTION TO TRANSIENT CAPILLARY
ISOTACHOPHORESIS FOR THE ANALYSIS OF DRUGS IN BIOLOGICAL SAMPLES

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Martin Lučaj

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.

BRNO 2020

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1488/2019 Akademický rok: 2019/20
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Student: **Bc. Martin Lučaj**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Spojení mikro–elektromembránové extrakce s transientní kapilární izotachoforézou pro analýzu léčiv v biologických vzorcích

Zadání diplomové práce:

Literární rešerše využití a spojení mikroextrakčních technik, založené na volné kapalně membráně s transientní izotachoforézou (tITP)

Otestování různých uspořádání pro nástřik vzorku elektrokinetickým dávkováním ve spojení s transientní izotachoforézou (EKS–tITP).

Získání vybraných analytických parametrů pro spojení EKS–tITP s mikroextrakčními technikami využívající volnou kapalnou membránu (FLM) pro analýzy vybraných léčiv z biologických vzorků.

Termín odevzdání diplomové práce: 29.5.2020:

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

Bc. Martin Lučaj
student(ka)

Ing. Miloš Dvořák, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2020

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Diplomová práca je zameraná na vývoj inštrumentálneho usporiadania in-line prepojenia mikroelektromembránovej extrakcie (μ EME) s kapilárnou elektroforézou (CE) pre analýzy vybraných liečiv v telových tekutinách. Doteraz bolo publikované priame spojenie μ EME a CE len pre analýzu riečnej vody [1]. Byť publikované spojenie bolo realizované v rámci komerčnej CE, naráža na niekoľko úskalí, ktoré môžu mať negatívny dopad na analýzy vzoriek s komplexnou maticou. Usporiadanie prezentované v tejto diplomovej práci tieto nedostatky eliminuje a otvára tak možnosti rozšíriť aplikácie μ EME-CE prepojenia aj na vzorky s komplexnou biologickou maticou.

Jadrom experimentálnej časti je optimalizácia základných extrakčných a separačných podmienok pre stanovenie vybraných modelových bázičných liečiv (nortriptylinu, haloperidolu a loperamidu) s využitím tranzientnej izotachoforézy (tITP). Extrakčné podmienky boli optimalizované pre prenos analytov z komplexnej matrice (ľudská moč) cez voľnú kvapalnú membránu (FLM) s priamym dávkovaním elektrokinetickým superchargingom (EKS) do kapiláry CE systému. Následne optimalizované podmienky boli aplikované na krv vo forme suchých krvných bodiek, ktorá je z pohľadu súčasných analytických trendov pre sledovanie koncentrácie liečiv v krvi zaujímavá. Reprodukovateľnosť meraní bola $< 10\%$ RSD pre obidve matrice. Toto usporiadanie umožnilo prenos, prečistenie a zakoncentrovanie analytov v kapiláre v rámci jedného kroku s následnou analýzou pomocou tej istej inštrumentácie. Vývoj tohoto nového inštrumentálneho usporiadania otvoril nové možnosti pre rýchle analýzy biologických vzoriek. Toto prepojenie ponúka výrazne vyššiu časovú úsporu (až 15 krát) oproti klasickým EME prístupom.

ABSTRACT

The diploma thesis is focused on the development of in-line micro-electromembrane extraction (μ EME) coupled to capillary electrophoresis (CE) for the analysis of selected drugs in body fluids. Up to now, direct coupling of μ EME to CE has been demonstrated on diluted river samples only [1]. Although the published set-up has been implemented within a commercial CE it suffers from several drawbacks that can have a negative impact on the analysis of samples with higher complexity. The instrumental arrangement presented in this thesis eliminates these deficiencies.

The experimental part is based on the optimization of fundamental extraction and separation conditions for the analysis of model basic drugs (nortriptyline, haloperidol, loperamide) with the use of transient isotachopheresis (tITP) principle. The extraction conditions were optimized for electro-driven transport of basic analytes from complex matrices (urine) through free liquid membrane followed by injection step utilized by electrokinetic supercharging (EKS), which focused target analytes into the CE capillary. Optimized conditions have been applied on blood in the form of dry blood spots, which are highly attractive samples in the current

clinical analysis. The repeatability of the measurements was < 10% RSD for both matrices. The developed instrumental set-up allowed the transfer, purification, preconcentration and injection of analytes into the capillary in single step and the same instrumentation was used for the subsequent CE. This μ EME-CE coupling represents a new approach for the fast analysis of biological samples and offers a significant reduction of analysis times (up to 15-fold) in comparison to conventional EME and μ EME approaches.

KLÚČOVÉ SLOVÁ

Kapilárna elektroforéza, mikro-elektromembránova extrakcia, voľná kvapalná membrána, tranzientná izotachoforéza, elektrokinetický supercharging, komplexné biologické vzorky, bázické liečivá.

KEYWORDS

Capillary electrophoresis, micro-electro membrane extraction, free liquid membrane, transient isotachopheresis, electrokinetic supercharging, complex biological samples, basic drugs.

LUČAJ, Martin. *Spojení mikro-elektromembránové extrakce s transientní kapilární izotachoforézou pro analýzu léčiv v biologických vzorcích*. Brno, 2020. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/125581>. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloš Dvořák.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracoval samostatne a že všetky použité literárne zdroje som správne a úplne citoval. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis študenta

Podakovanie:

Touto cestou by som rád poďakoval Ing. Milošovi Dvořákovi, Ph.D. za jeho odborné vedenie, užitočné rady, trpezlivosť a čas, ktorý mi venoval počas mojej diplomovej práce. Taktiež moje poďakovanie patrí aj RNDr. Pavlovi Kubáňovi, Ph.D., DSc. za príležitosť podieľať sa na vedeckej činnosti na oddelení elektromigračných metód na Ústave analytickej chémie Akadémie vied ČR, v.v.i. a za poskytnutie cenných rád. Moje poďakovanie patrí aj Ing. Lenke Ryšavej za obetavú pomoc a odborné vedenie. V neposlednej rade by som sa chcel poďakovať mojej priateľke a rodine za všetku podporu a prejav dôvery.

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 TEORETICKÁ ČASŤ	10
2.1 Mikroextrakčné techniky	10
2.2 Vývoj mikroextrakčných techník.....	10
2.2.1 Mikro-elektromembránová extrakcia (μ EME)	11
2.3 CE v spojení s mikroextrakčnými technikami	14
2.3.1 Spôsobý dávkovania vzoriek	16
2.4 In-line prekoncentračné techniky využívané v CE	17
2.4.1 tITP	17
2.4.2 EKS	18
2.5 Spojenie μ EME-EKS-tITP-CE	19
2.6 Ľudské telové tekutiny	21
2.6.1 Moč	21
2.6.2 Krv	21
2.6.3 Suché krvné bodky.....	21
2.7 Vlastnosti modelových bázických liečiv.....	22
2.8 Validačné parametre CE	22
2.8.1 Lineárny rozsah.....	22
2.8.2 Limit detekcie a limit kvantifikácie	23
2.8.3 Rozlíšenie.....	23
2.8.4 Počet teoretických poschodí	23
3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	24
3.1 Príprava roztokov	24
3.1.1 Zásobné roztoky	24
3.1.2 Pracovné roztoky	24
3.1.3 Príprava roztokov používaných pre mikroextrakcie	25
3.2 Príprava mikroextrakčnej jednotky	26
3.3 Metóda CE-UV	26
3.4 In-line usporiadanie μ EME v spojení s CE systémom	27
4 VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	29
4.1 Optimalizácia separačných podmienok	29
4.1.1 Výber BGE a modelových analytov	29

4.1.2	Optimalizácia separačného napätia.....	29
4.1.3	Optimalizácia koncentrácie zaostrovacieho elektrolytu	30
4.1.4	Optimalizácia doby HDI zaostrovacieho elektrolytu.....	31
4.2	Optimalizácia extrakčných podmienok vo fyziologickom roztoku	32
4.2.1	Výber zloženia organickej fázy používanej pre μ EME	32
4.2.2	Vplyv zloženia akceptorového roztoku na μ EME	34
4.2.3	Vplyv zloženia donorového roztoku na μ EME	36
4.2.4	Zhrnutie optimalizovaných podmienok pre fyziologický roztok.....	37
4.3	Aplikácia μ EME na reálnu maticu – ľudský moč	37
4.3.1	Vplyv zloženia reálnej matrice na μ EME.....	37
4.3.2	Vplyv zloženia akceptorového roztoku na μ EME.....	38
4.3.3	Optimalizácia doby EKS dávkovania	39
4.3.4	Optimalizácia objemu FLM pre μ EME	40
4.3.5	Optimalizácia objemu akceptorového roztoku	41
4.3.6	Optimalizácia objemu donorového roztoku μ EME.....	42
4.3.7	Optimalizácia extrakčného napätia μ EME	43
4.3.8	Optimalizácia finálnych podmienok pre aplikácie μ EME na ľudský moč..	44
4.3.9	Zhrnutie optimálnych podmienok pre ľudský moč.....	45
4.3.10	Pracovný rozsah a linearita metódy	46
4.4	Aplikácia μ EME na analýzu suchých krvných bodiek	47
4.4.1	Aplikácia optimalizovaných podmienok na suché krvné bodky	47
4.4.2	Vplyv zloženia reálnej matrice na μ EME.....	48
4.4.3	Zhrnutie optimálnych podmienok pre suché krvné bodky	49
4.4.4	Pracovný rozsah a linearita metódy	50
4.5	Porovnanie navrhutej inštrumentácie s ostatnými μ EME.....	51
5	ZÁVER.....	53
6	POUŽITÁ LITERATÚRA	54
7	ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK A SYMBOLOV.....	62

1 Úvod

Zložitá inštrumentácia analytických metód, nízka citlivosť a selektivita, vysoká spotreba pracovných roztokov a s tým spojená finančná náročnosť, poháňajú vývoj nových analytických postupov, ktoré sa snažia eliminovať vyššie spomínané nedostatky. Zvlášť komplikovaná býva analýza biologických vzoriek s komplexnou maticou, kde väčšina analytických techník vyžaduje navyše prečistenie vzorky od balastných látok ovplyvňujúcich vlastnú analýzu. V posledných rokoch sa čím ďalej viac rozvíja oblasť tzv. mikroextrakčných techník, ktoré minimalizujú spotrebu vzorky a taktiež pracovných roztokov a umožňujú prevedenie účinných rýchlych extrakcií s minimálnym zásahom operátora [2–3].

Tieto usporiadania sú svojim charakterom predurčené k výhodnému prepojeniu prečisťovacieho kroku s následnými analýzami vzoriek. Inštrumentálne nenáročnou, lacnou a z hľadiska účinnosti, citlivosti, rýchlosti a malých spotrieb roztokov sa ukázala byť vhodnou separačnou analytickou technikou kapilárna elektroforéza (CE). Tá vyniká najmä v možnostiach at-, in- a on-line prepojenia s mikroextrakčnými (najmä extrakcia kvapalina-kvapalina) a prekoncentračnými technikami. Ťažiskom tejto práce je in-line prepojenie mikroextrakčnej techniky, využívajúcu voľnú kvapalnú membránu (FLM) s následným analytickým stanovením pomocou CE, ktoré spojuje výhody oboch systémov.

Mikro-elektromembránová extrakcia (μ EME) bola už mnohokrát uplatnená pre analýzy biologických vzoriek, najmä v off-line režime [4–5]. Mikroextrakcie kvapalina-kvapalina pracujú s mikroobjemom všetkých fáz a aplikovanie elektrického poľa urýchľuje prenosy látok. Následná CE ako analytická koncovka, navyiac umožňuje separované analyty zakoncentrovať priamo počas separačného kroku [6]. Vďaka podobnosti komponentov použitých techník sa tak unikátne ponúka in-line prepojenie oboch inštrumentácií. Prevedenie elektromembránovej extrakcie cez selektívnu voľnú kvapalnú membránu prečistí a zakoncentruje analyty v separačnej kapiláre, v ktorej budú následne analyzované a zaostrené pomocou tITP. Metóda využíva kombináciu unikátneho prípadu elektrokinetického dávkovania analytov priamo do separačnej kapiláry, tzv. elektrokinetický supercharging (EKS) a prekoncentráciu na pohyblivom rozhraní vedúceho elektrolytu tzv. tranzientná izotachoforéza (tITP) [7]. Toto usporiadanie je finančne nenáročné, spotrebovávajú mikrolitrové množstvá organických rozpúšťadiel aj vzoriek a zároveň sú dosiahnuté nízke extrakčné časy oproti off-line systémom. Vďaka spojeniu extrakčného a dávkovacieho kroku je tak dosiahnutá značná úspora času.

Táto práca rozširuje uplatnenie μ EME-CE spojenia o analýzy biologických vzoriek s komplexnou maticou, ktoré doteraz nebolo publikované, v obdobnom usporiadaní bolo odskúšané zatiaľ len na vzorkách riedenej riečnej vody [1]. Ako modelové reálne matrice boli zvolené neriedená ľudská moč a kapilárna krv vo forme rozpúšťaných suchých krvných bodiek.

Práca je orientovaná na overenie inštrumentálnych možností a pozorovania chovania sa systému pri aplikácii ľudských telových tekutín a optimalizácií základných extrakčných

a separačných podmienok, na ktoré bude možné naviazať ďalším vývojom metódy pre dosiahnutie limitov detekcie na úrovni terapeutických koncentrácií vybraných analytov v krvi a iných biologických tekutinách s budúcou možnosťou automatizácie celej metódy. Preto práca bola zúžená na vybrané modelové analyty – tri bázické liečivá (nortriptylin, haloperidol, loperamid) a dve reálne matrice. Na jednej (ľudský moč) prebiehala optimalizácia systému z dôvodu jednoduchej dostupnosti, ľahkosti jej spracovania z hľadiska prídavkov liečiv do matrice a operácií v rámci extrakčných krokov. Ďalšou zvolenou matricou bol eluát z krvnej bodky, na ktorom bola otestovaná kompatibilita vybraných optimálnych podmienok. Táto matrica je zo súčasných trendov vysoko sledovaná z hľadiska vývoja rady inštrumentálnych usporiadaní pre analytické a klinické analýzy pri stanovení terapeutických koncentrácií analytov, čo je cieľom tejto techniky.

2 Teoretická časť

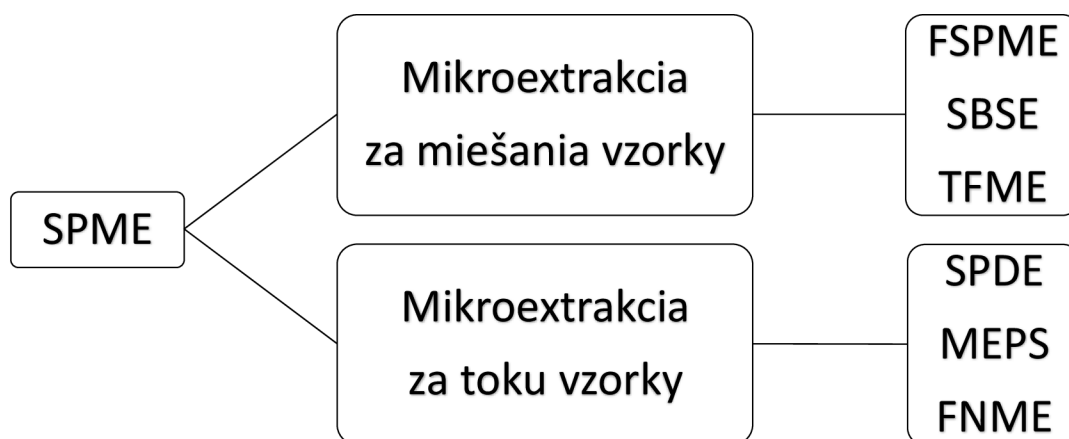
2.1 Mikroextrakčné techniky

Príprava vzorky zahrňujúca extrakciu je bežným krokom úpravy vzorky ešte pred jej vlastnou analýzou, napríklad pomocou metód elektroforetických, chromatografických, alebo hmotnostnej spektrometrie. Hlavným cieľom extrakcie je prečistenie vzorky odstránením matrice interferujúcej s analytmi záujmu. Následne takto upravená vzorka je analyzovaná pomocou vhodného analytického systému bez rušivých vplyvov matrice. Väčšina dnešných predúprav vzoriek sú vykonávané pomocou klasických techník ako extrakcia tuhú fázou (SPE) [2], alebo extrakcia kvapalina-kvapalina (LLE) [3]. V posledných rokoch je výskum zameraný na miniaturizáciu klasických extrakčných techník [8–10].

Mikroextrakcie sú zjednodušené a zminiaturizované techniky slúžiace pre predúpravu vzoriek z dôrazom kladeným na minimálne použitie rozpúšťadiel a vzorky. Môžu zahrňovať viackrokovú predúpravu vzorky zosumarizovanú do jedného úkonu, ktorý zahrňuje prečistenie a prípadne obohatenie analytov záujmu vo výslednom extrakte. V porovnaní s pôvodnými extrakciami, alebo inými druhmi príprav vzoriek ponúkajú mikroextrakčné techniky radu výhod. Napríklad efektívne využitie nižších objemov, elimináciu početných nedostatkov, ktoré boli zapríčinené viacstupňovou predúpravou vzorky (rozpustenie analytov v solvente, centrifugácia, odparenie a iné) a zníženie prevádzkových nákladov [11].

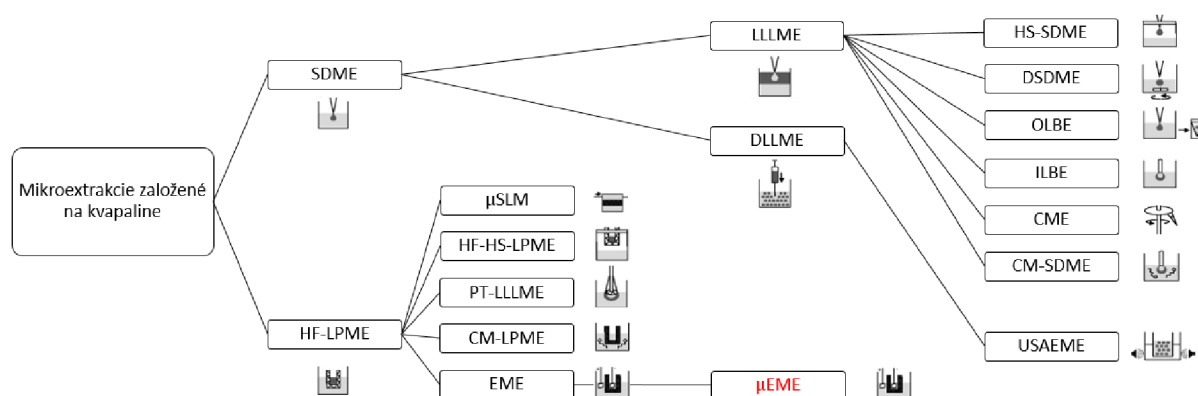
2.2 Vývoj mikroextrakčných techník

V roku 1990 Pawliszyn a kolektív predstavili prvú techniku, solid-phase microextraction (SPME) [12], vychádzajúcu z princípu SPE. Následne sa SPME stala komerčne dostupnou a umožnila vznik nových mikroextrakčných techník. Ich delenie je zobrazené na obr. 1 [11].



Obr. 1: Delenie mikroextrakčných techník, ktoré sú založené na extrakcii na tuhých fáz [13]. Solid-phase microextraction (SPME) [12], fiber solid-phase microextraction (FSPME) [14], stir-bar-sorptive extraction (SBSE) [15], thin film solid-phase microextraction (TFME) [16], solid-phase disk extraction (SPDE) [17], microextraction by packed sorbent (MEPS) [18], Fiber-packed needle microextraction (FNME) [19].

Samotné započatie miniaturizácie LLE sa datuje od roku 1986 [20]. Následne v období od roku 1996 nasledoval vývoj miniaturizovanej formy LLE ako liquid-phase microextraction (LPME) [8], ktorá je delená na single-drop microextraction (SDME) [8], dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) [10] a hollow-fiber liquid phase microextraction (HF-LPME) [21]. Technika HF-LPME bola v roku 2006 Pedersen-Bjergaardom a Rasmussenom modifikovaná pridaním elektrického poľa, ktorý urýchlil prenos analytov a bola nazvaná ako elektromembránova extrakcia (EME) [22]. V roku 2014 bola prevedená miniaturizácia EME vyvinutím tzv. mikro-elektromembránová extrakcia (μ EME) [23]. Prehľad mikroextrakčných techník a ich delenie je znázornené na obr. 2 [11].



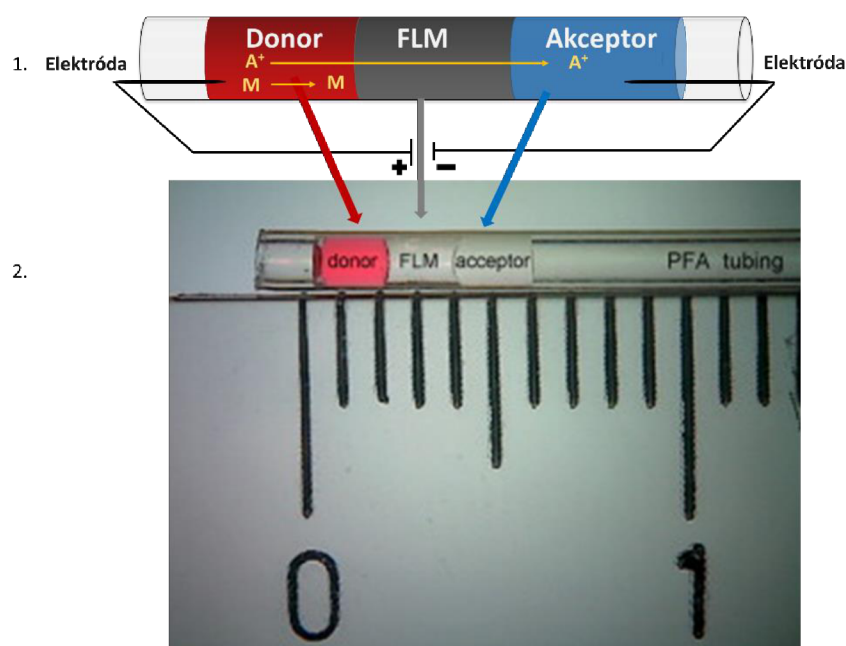
Obr. 2: Mikroextrakčné techniky založené na kvapalnej fáze [24]. Liquid-phase microextraction (LPME) [8], single drop microextraction (SDME) [8], dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) [10], hollow fiber liquid-phase microextraction (HF-LPME) [21], ultrasound-assisted emulsification microextraction (USAEME) [25], in-line back-extraction (ILBE) [26], carrier-mediated single-drop microextraction (CM-SDME) [27], directly suspended droplet microextraction (DSDME) [28], centrifuge microextraction (CME) [29], on-line back-extraction (OLBE) [30], headspace single-drop microextraction (HS-SDME) [31], elektromembránova extrakcia (EME) [22], mikro-elektromembránová extrakcia (μ EME) [23], droplet-membrane-droplet liquid-phase microextraction (DMD-LPME) [32], phase transfer based liquid-liquid-liquid microextraction (PT-LLLME) [33], carrier-mediated liquid-phase microextraction (CM-LPME) [34], hollow fiber and headspace liquid-phase microextraction (HF-HS-LPME) [35], supported liquid membrane (SLM) [36].

2.2.1 Mikro-elektromembránová extrakcia (μ EME)

Často používané usporiadanie EME obsahuje kvapalnú membránu umiestnenú na pevnom nosiči (SLM) vyrobeného z polypropylénu (PP), alebo polytetraflúoroetylénu (PTFE). Póry polyméru sú impregnované organickým rozpúšťadlom nemiešateľným s vodou. Naimpregnovaná SLM je umiestnená medzi akceptorovým a donorovým roztokom, kde tvorí bariéru, ktorá umožňuje selektívny prechod analytov. V akceptorovom a donorovom roztoku sú ponorené elektródy, na ktoré je vkladané napätie. Prenos analytov je sprostredkovaný

cez organickú fázu umiestnenej na polymérnej membráne a je urýchlený vkladným elektrickým poľom [37].

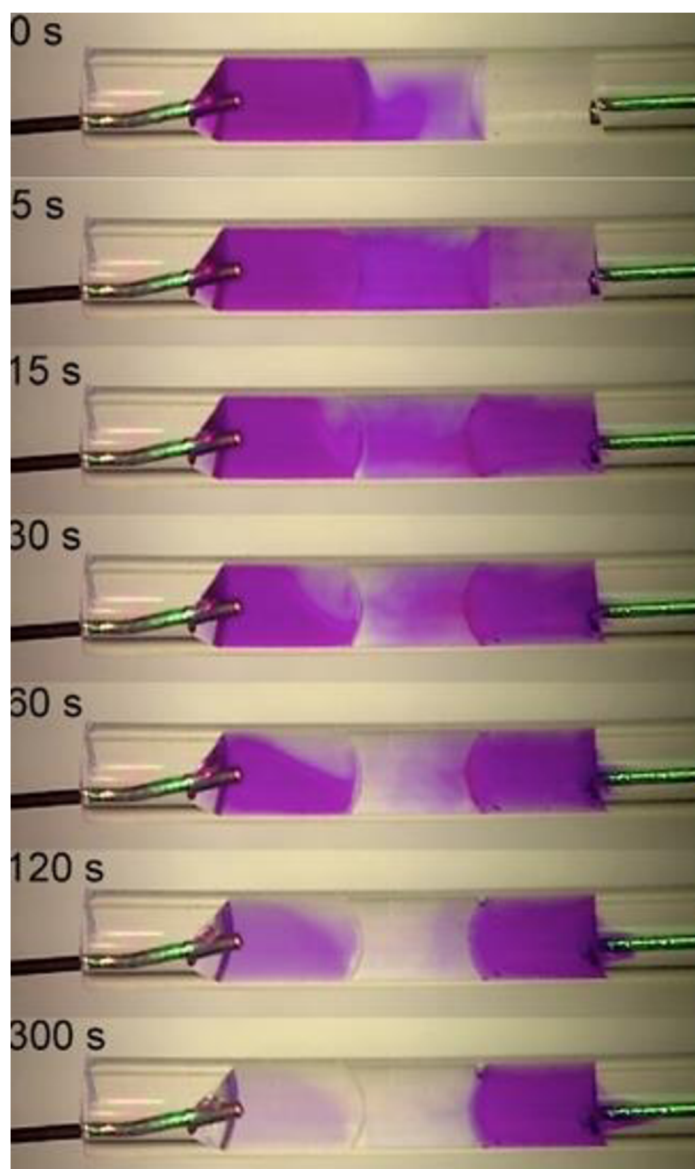
Za posledné roky bolo vyvinutých niekoľko ďalších prístupov v oblasti EME [38–42]. Jeden z nich bol publikovaný Kubáňom a Bočekom [23], ktorí používali namiesto SLM FLM, ktorú tvorí iba organické rozpúšťadlo (napríklad 1-pentanol, 1-hexanol, 1-oktanol, 1-ethyl-2-nitrobenzén (ENB), 2-nitrofenyloctyléter (NPOE) a iné). Všetky kvapalné fázy (donor, FLM, akceptor) sú umiestnené v transparentnej polymérnej kapiláre vyrobenej napríklad z inertného materiálu perfluóralkoxyonátu (PFA). Fázy sú v kapiláre stabilné a držané pomocou kapilárnych síl. U μ EME je presne definovaný objem a hrúbka organickej, donorovej a akceptorovej fázy. Elektródy sú v rovnakom usporiadaní ako pri EME. Hnacou silou μ EME je elektrický potenciál vkladný na celý systém (akceptor, FLM, donor). Potenciál v systéme je udržiavaný pomocou externého zdroja napätia. Podmienkou funkčnej extrakcie elektrickým poľom je ionizácia analytov. V závislosti na pK_a daného liečiva je nutné previesť ionizáciu bázických liečiv okyslením prostredia a pre acidické liečivá je nutné previesť ich ionizáciu alkalizáciou. Jednotka μ EME je zobrazená na obr. 3. Výťažnosť a selektivita mikroextrakcie je priamo závislá na vlastnostiach FLM (objem, zloženie), aplikovaného potenciálu, zloženia a pH hodnoty donorového a akceptorového roztoku [23, 43].



Obr. 3: Schéma (1): Mikroextrakčná jednotka μ EME a princíp prenosu analytov cez FLM v polymérnej kapiláre. Nabitý analyt (A^+), matrica (M). Schéma (2): možné reálne prevedenie μ EME, kapilára z PFA o vnútornom priemere 1,0 mm a vonkajšom priemere 1,6 mm obsahuje 1,5 μ l akceptoru, 1,5 μ l FLM a 1,5 μ l donoru [23].

μ EME využíva menšie objemy všetkých troch fáz (akceptor, FLM, donor). U EME je možná vizualizácia extrakčného procesu v reálnom čase (viď obr. 4) vďaka transparentnej PFA

kapiláre. FLM v porovnaní s SLM má lepšiu možnosť optimalizácie hrúbky membrány, ktorá je daná priemerom kapiláry a objemom FLM. Poskytuje lepšiu stabilitu systému pri aplikácii elektrického potenciálu pri analýze biologických vzoriek (krvné sérum, ľudský moč). Výhodou je možná automatizácia celej metódy [44]. Inštrumentálne usporiadanie je oproti difúznym extrakciám komplexnejšie o jeden prvok (externý zdroj napätia), ktorý je avšak cenovo a komerčne dostupný. Problematika μ EME s FLM je dnes ešte stále aktuálnym predmetom výskumu [23, 43].



Obr. 4: Znázornenie prenosu analytov záujmu (kryštalová violet) vplyvom elektrického poľa cez FLM v závislosti na čase [23].

μ EME systémy sú väčšinou realizované vkladáním konštantného napätia na elektródy. Pri konštantnom napätí sa elektrický prúd v systéme mení na základe Ohmovo zákona (viď rovnica č. (1) [45–46]).

$$I = \frac{U}{R}, \quad (1)$$

kde I je elektrický prúd, U značí napätie a R je odpor.

Celkový odpor systému je daný nízkou vodivosťou FLM. Aj malé zmeny v extrakčných podmienkach vyvolajú merateľné zmeny elektrického prúdu. Po aplikácii napätia na elektródy dochádza k prenosu hmoty cez FLM. Prenos vychádza zo základných princípov Faradayových zákonov (viď rovnice (2) a (3)) [47–48].

$$m = A \cdot I \cdot t, \quad (2)$$

kde m značí hmotnosť látky, A je elektrochemický ekvivalent, I vyjadruje prúd a t je čas.

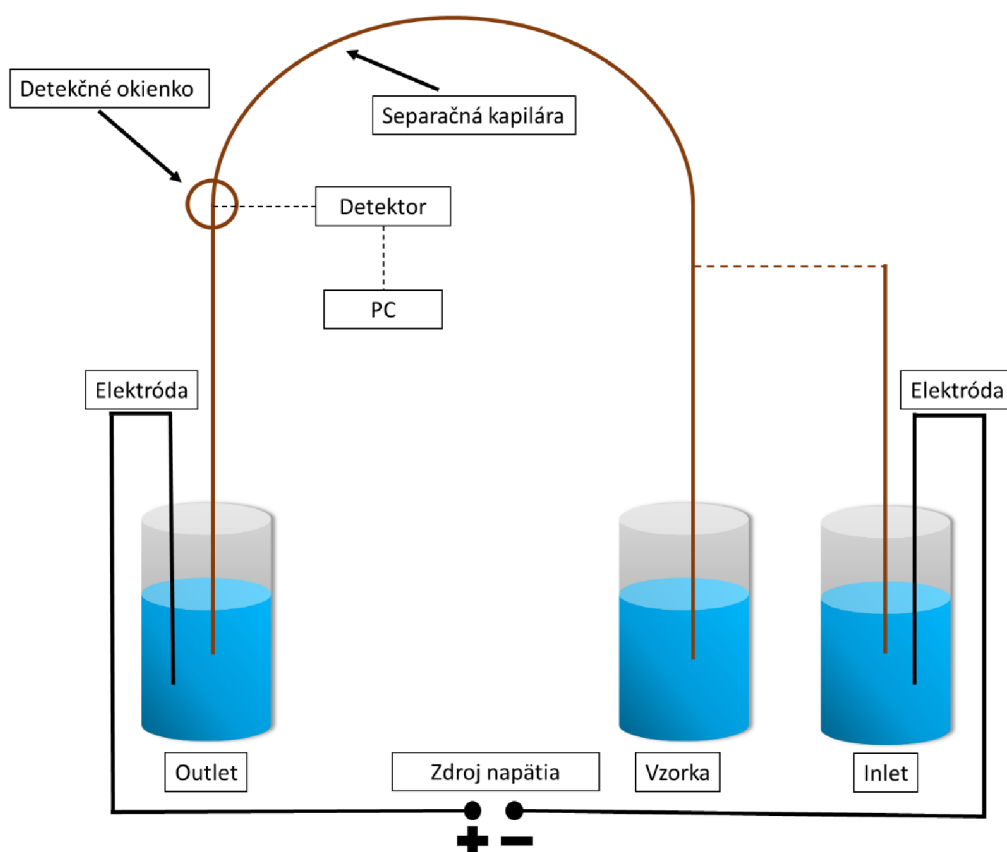
$$A = \frac{M_m}{F \cdot z}, \quad (3)$$

kde F značí Faradayovu konštantu, z je nábojové číslo a M_m označuje atómovú hmotnosť látky.

2.3 CE v spojení s mikroextrakčnými technikami

CE je moderná separačná metóda, pri ktorej nabitá analyta migrujú pôsobením elektrického poľa k opačne nabitým elektródam. Elektrické pole je vytvorené vkladáním napätia (typicky do 30 kV) medzi elektródy, ktoré sú ponorené v základnom elektrolyte (BGE). Separácia analytov prebieha v úzkej kremennej kapiláre pokrytej polyimidom (o vnútornom priemere 25–100 μm) naplnenej BGE. Delenie iónov je založené na rozdielnych elektroforetických mobilitách (μ_e). Smer častíc je daný znamienkom náboja a rýchlosť závisí na veľkosti častice a veľkosti náboja separovanej častice. Vzorka je dávkováná (hydrodynamicky, alebo elektrokineticky (viď v kapitole 2.3.1)) do kapiláry obsahujúcej BGE a predstavuje zvyčajne 1–2 % jej objemu. Po aplikácii separačného napätia sa vzorka rozdeľuje do samostatných zón. Detekčný signál je vyhodnotený pomocou počítača a výsledný záznam sa nazýva elektroforegram [49–50].

CE použitá v tejto práci bola vybraná na základe jej jednoduchej inštrumentácie, nízkych prevádzkových nákladov na pracovné roztoky a spotrebného materiálu a vysokej separačnej účinnosti. Vďaka inštrumentálnej jednoduchosti poskytuje možnosť ľahkého prepojenia s mikroextrakčnými technikami ako napríklad μEME (viď v kapitole 2.2.1). Ďalej dovoľuje použiť jednoduché prekoncentračné techniky ako napríklad EKS prebiehajúci pred analýzou, alebo tITP, ktorá prebieha priamo v kapiláre počas analýzy. (viď v kapitolách 2.4.2 a 2.4.1). Inštrumentácia CE je zobrazená na obr. 5 [49–50].



Obr. 5: Schéma inštrumentácie CE [50].

Elektroforetická mobilita (μ_e) charakterizuje pohyblivosť častíc v elektrickom poli. Predstavuje mieru migračnej rýchlosti a je charakteristickým parametrom nabitých častíc. Závisí na náboji a na veľkosti molekuly, alebo častice. Je ovplyvnená typom, koncentráciou, teplotou, pH hodnotou a zložením BGE. Častice s vyššou μ_e sa pohybujú elektrickým poľom rýchlejšie ako častice s nižšou μ_e . Na základe tohto javu dochádza k rozdeleniu častíc do jednotlivých zón. Pre μ_e platí vzťah vid' rovnica č. (4) [48–51].

$$\mu_e = \frac{v}{E} = \frac{Q}{k} = \frac{e_0}{6\pi} \cdot \frac{1}{\eta} \cdot \frac{z}{R}, \quad (4)$$

v značí elektroforetickú rýchlosť iónu, E je intenzita elektrického poľa, R značí polomer analytov, η označuje viskozitu roztoku, z je efektívny náboj analytov, e_0 predstavuje elementárny náboj analytov [51].

Z elektroforegramu je možné vypočítať zdanlivú mobilitu (μ_a). Môže byť určená na základe migračného času analytov. Migračný čas je definovaný ako čas, ktorý je potrebný pre migráciu rozpustenej látky od doby nástreku až po jej detekciu. Môže byť prakticky vypočítaná podľa odvodenej rovnice č. (5) [48–51].

$$\mu_a = \frac{lL}{tU}, \quad (5)$$

l je efektívna dĺžka kapiláry, t značí migračný čas analytov, L je celková dĺžka kapiláry, U značí aplikované napätie [51].

Vnútoraná stena kremennej kapiláry je tvorená silanolovými skupinami (Si-OH), ktoré sa pri kontakte s BGE disociujú. Záporný náboj vytvorený silanolovými skupinami vyrovnávaný kladným nábojom z BGE umožňuje vznik elektrickej dvojvrstvy. Katióny, ktoré sa nachádzajú ďalej od steny kapiláry tvoria difúznú vrstvu. Po aplikácii separačného napätia dochádza k pohybu difúznej vrstvy, vďaka solvácii okolitého elektrolytu smerom ku katóde. Tento jav sa nazýva elektroosmotický tok (EOF) a hrá dôležitú úlohu v separácii a migrácii iónov v kapiláre. Elektroforetická mobilita EOF býva vyššia ako je μ_e niektorých organických aniónov, čím môže byť zabezpečená súčasná migrácia katiónov, neutrálnych častíc a aniónov v jednom smere [48–51]. EOF je možné vypočítať podľa rovnice č. (6).

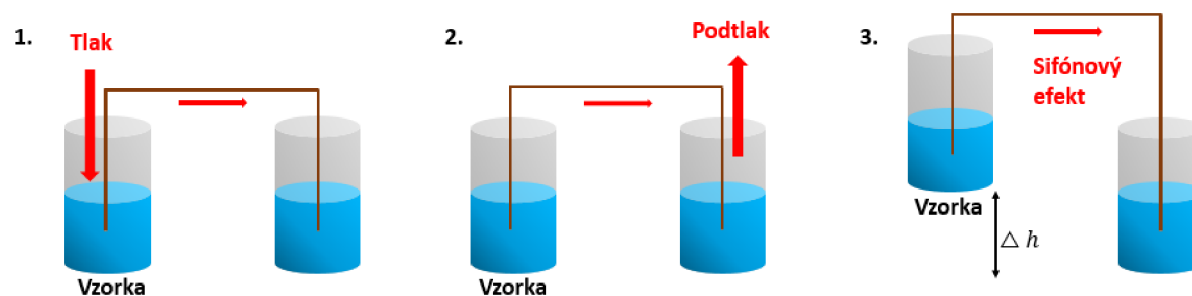
$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta}, \quad (6)$$

kde ε značí dielektrickú konštantu, ζ je zeta potenciál a η značí viskozitu roztoku [50].

2.3.1 Spôsobý dávkovania vzoriek

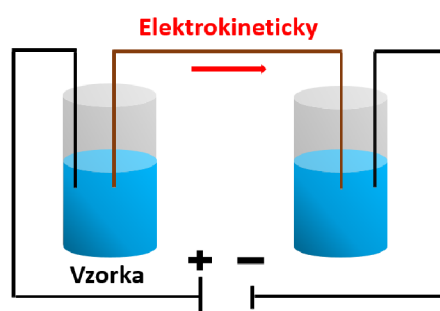
Dávkovanie do CE systému je limitované vnútorným priemerom separačnej kapiláry. Dĺžka zóny by v kapiláre nemala presahovať 2 % z celkovej dĺžky kapiláry (spravidla objem 1–50 nl). Dávkovanie malých objemov predstavuje výhodu pre viacnásobnú analýzu z tej istej vzorky. V tejto práci bola využívaná kombinácia hydrodynamického (HDI) a elektrokinetického (EKI) dávkovania. Hydrodynamicky bola dávkovaná zóna octanu amónneho (NH_4Ac) a elektrokineticky bola dávkovaná vzorka [50, 52].

Najpoužívanjšou metódou dávkovania je HDI. Kapilára je ponorená do vialky, ktorá obsahuje vzorku a na jej dávkovacom konci sa pôsobí tlakom, prípadne na opačnej strane kapiláry pôsobí podtlak. Treťou možnosťou je dávkovanie výškovým rozdielom hladín tzv. sifónovým efektom. HDI zabezpečuje reprezentatívne dávkovanie vzorky. Nevýhodou môže byť obťažnejšie dávkovanie malých objemov. Všetky tri možnosti HDI sú zobrazené na obr. 6 [50–52].



Obr. 6: Hydrodynamické dávkovanie: 1) tlakom 2) podtlakom 3) sifónovým efektom [50].

Pri elektrokinetickom dávkovaní je jeden koniec kapiláry ponorený do vialky so vzorkou a druhý koniec kapiláry je ponorený do vialky s BGE. V oboch vialkách sú prítomné elektródy, na ktoré je vkladané dávkovacie napätie (3–5 krát nižšie ako je separačné napätie). Doba dávkovania trvá typicky 10–300 s. Princípom EKI je migrácia nabitých analytov do kapiláry pôsobením elektrického poľa. Analyty migrujú do kapiláry postupne na základe ich μ_e a EOF. Schéma EKI je znázornená na obr. 7. Pri EKI závisí nadávkované množstvo na μ_e analytov a EOF. Táto závislosť je diskriminačná, pretože sa prednostne dávajú ióny s vyššou μ_e . Pokiaľ má vzorka nižšiu vodivosť než BGE, ktorý sa nachádza v kapiláre, je možné EKI využívať k zakoncentrovaniu vzorky tzv. stacking. EKI má nižšiu reprodukovateľnosť. Výhodou je možné prepojenie spolu s tITP v tzv. EKS vid' kapitola 2.4.2 [50–52].



Obr. 7: Princíp elektrokinetického dávkovania [50].

2.4 In-line prekoncentračné techniky využívané v CE

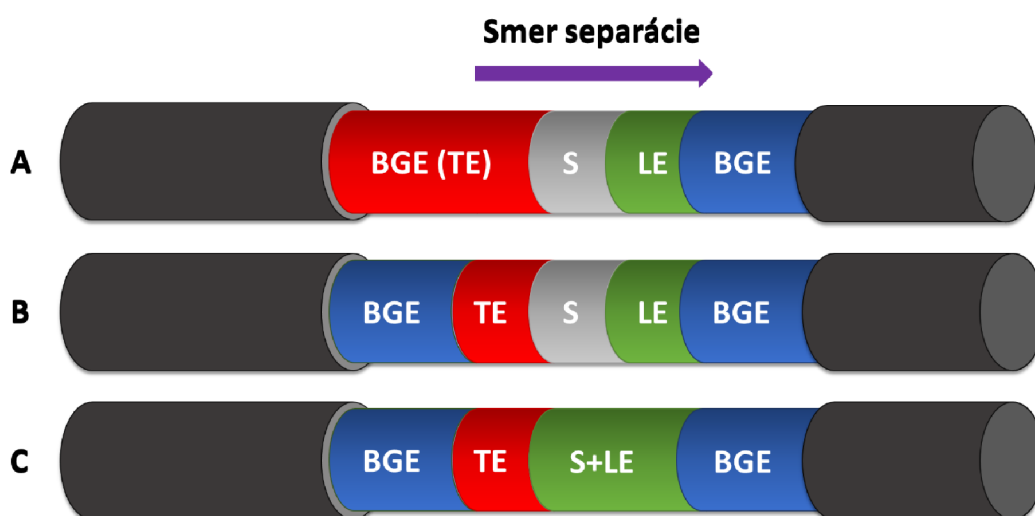
CE sa stala využívanou technikou v oblasti farmaceutickej a klinickej praxi z dôvodu finančnej nenáročnosti, rýchlej separácie a možnosti prepojenia s mikroextrakčnými technikami. Malé vnútorné priemery v kapiláre, krátka optická dráha systému CE spôsobujú nižšiu citlivosť UV-VIS detekcie v porovnaní s inými separačnými metódami. Riešením uvedeného problému je možnosť prekoncentrácie analytov pomocou prekoncentračných techník. V tejto práci je použité in-line prepojenie prekoncentračných techník tITP vid' v kapitolách 2.4.1 a EKS v 2.4.2 [6].

2.4.1 tITP

tITP je jednou z prekoncentračných techník využívajúca pre separáciu iónov ich rozdielne hodnoty μ_e . Je to prekoncentračná technika, ktorá môže (selektívne) zvýšiť koncentráciu analytov bez ohľadu na vodivosť vzorky. tITP existuje v niekoľkých usporiadaniach. V prvom usporiadaní sa do kapiláry obsahujúcej BGE dávkuje vedúci elektrolyt (LE) o nižšom objeme voči terminačnému elektrolytu (TE). LE je charakteristický najvyššou μ_e zo všetkých zúčastnených fáz. Za ním je dávkovaná zóna vzorky a následne zóna (TE) o najnižšej μ_e zo všetkých zúčastnených fáz. Pokiaľ BGE splňuje podmienku o najnižšej μ_e môže v kapiláre zastupovať úlohu TE. Princíp je zobrazený na obr. 8 A). Druhou alternatívou

je dávkovanie všetkých troch fáz (LE, vzorky a TE) za sebou ako samostatné zóny do kapiláry naplnenej BGE (vid' obr. 8 B). Ďalšou možnosťou je pridanie požadovaného LE do samotnej vzorky a dávkovať ich spoločne do kapiláry ako jednu zónu (vid' obr. 8 C). V niektorých prípadoch tITP usporiadanie využíva ióny prirodzene vyskytujúce sa v matrici, ktoré prevezmú úlohu LE. Takýto jav sa nazýva ako samozaostrovací efekt a rozloženie v kapiláre je rovnaké ako v prípade 8 C. [7, 53–54]. Pre účinnú separáciu je potrebné zaistiť koncentráciu LE a TE (minimálne až 50 krát vyššiu) ako je koncentrácia analytov záujmu [7].

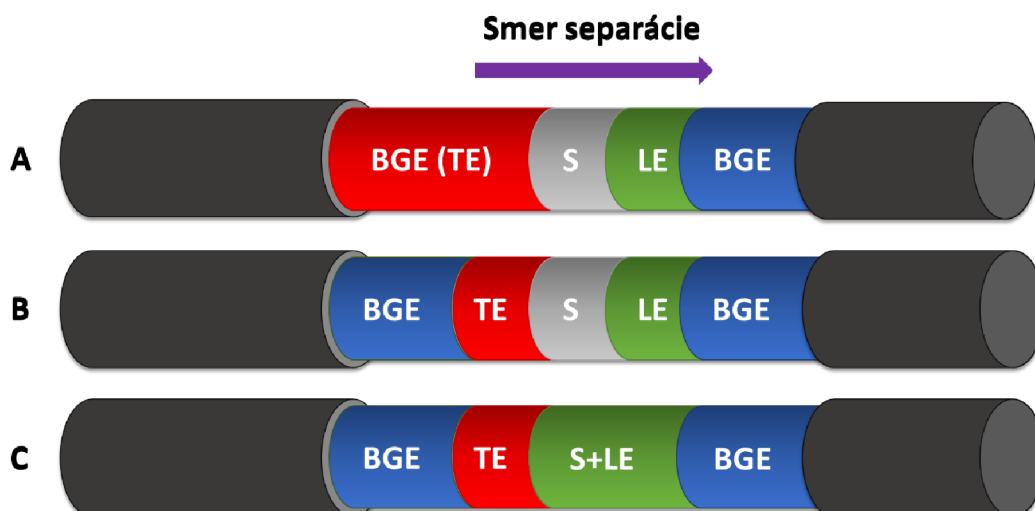
Po aplikácii separačného napätia sa analyty dočasne zaostria medzi LE a TE na základe ich μ_e až kým režim separácie neprejde plynule z tITP do režimu CZE, kde dochádza k detekcii zaostrych a separovaných zón jednotlivých iónov. Táto technika je bežne využívaná v in-line prepojení s CE na prekoncentráciu vzoriek biologických a odpadných vôd [7, 53–54].



Obr. 8: Princíp tITP v kremennej kapiláre. TE-terminačný elektrolyt, LE-vedúci elektrolyt, BGE-základný elektrolyt, S-vzorka. A) tITP, kde BGE zastáva rolu TE, B) konvenčná tITP, C) tITP indukovaná vložení LE do vzorky, [7].

2.4.2 EKS

EKS je on-line prekoncentračná technika pre CE, ktorá kombinuje EKI a tITP. Pri EKS sa hydrodynamicky dávkuje LE do separačnej kapiláry obsahujúcej BGE. Následne je za zónu LE elektrokinetickým dávkovaním pridaná zóna vzorky. Za zónu vzorky je hydrodynamicky dávkovaná krátka zóna TE (BGE). Po aplikácii separačného napätia sa difúzne pásmo sledovaných analytov prekoncentruje a migruje medzi LE a TE pomocou tITP. Tento proces prebieha až dokým tITP plynule neprejde na separáciu analytov pomocou CZE. EKS je jednoduchá, výkonná technika umožňujúca on-line prekoncentráciu stanovovaných iónov, tým dochádza k zvýšeniu citlivosti analytického systému. Princíp EKS je zobrazený na obr. 9 [54–56].



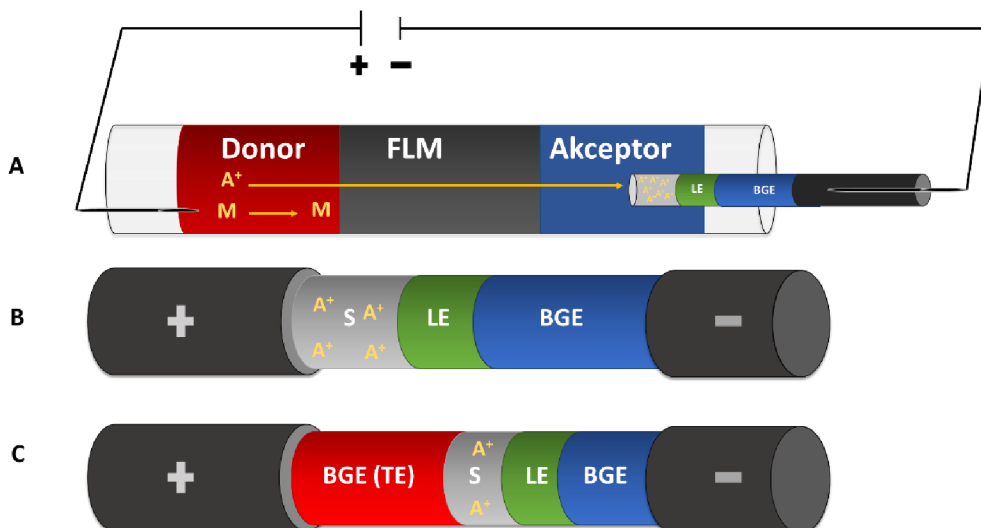
Obr. 9: Princíp EKS dávkovania. A) hydrodynamické dávkovanie LE hneď za zónou BGE, B) elektrokinetické dávkovanie vzorky (S), C) hydrodynamické dávkovanie TE [56].

2.5 Spojenie μ EME-EKS-tITP-CE

Dopyt po analytických metódach s vysokou citlivosťou a rozlíšením, ktoré sú zároveň vhodné pre analýzu biologických vzoriek je vysoký. Komplexná matrica prítomná v biologickej vzorke spôsobuje problém pri kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze. Ideálna metóda pre predúpravu vzoriek by mala spoľahlivo eliminovať častice interferujúce s analytmi záujmu. Na zadanú problematiku bolo v posledných rokoch publikovaných niekoľko prác [57]. Veľmi efektívnou mikroextrakčnou technikou na prečistenie vzorky od prebytočnej biologickej matrice sa javí μ EME (viď kapitola 2.2.1) [23].

Ďalšia požiadavka efektívneho analytického systému je kladená na zvýšenie jeho citlivosti. Zvýšenie citlivosti CE môže byť dosiahnuté pomocou spojenia mikroextrakčných a prekoncentračných techník ako napríklad EKS (viď kapitola 2.4.2) [58]. Porovnanie citlivosti prekoncentračných techník je zobrazené v tab. 1.

In-line prepojenie μ EME extrakcie za využitia FLM s EKS a tITP s CE (μ EME-EKS-tITP-CE) zabezpečuje prečistenie a prekoncentráciu vzorky v tej istej kapiláre. Selektívne vybrané ióny pochádzajúce z donorového roztoku sú pomocou EKS dávkované priamo do separačnej kapiláry naplnenej BGE. V kapiláre je vzorka dočasne zaostrená a prekoncentrovaná pomocou tITP a následne separovaná do úzkych zón prostredníctvom CZE. Prezentovaný postup použitý v tejto diplomovej práci zvyšuje citlivosť metódy oproti μ EME-CE [23]. Predložená metóda má minimálne nároky na spotrebu vzorky a pracovných roztokov a je finančne a inštrumentálne nenáročná. Predstavená metóda je zobrazená na obr. 10.



Obr. 10: Schéma μ EME-EKS-tITP-CE. V časti A je znázornené in-line prepojenie μ EME-CE, B popisuje EKS v kapiláre a C zobrazuje proces tITP prebiehajúci v kapiláre.

Tab. 1: Porovnanie citlivosti prekoncentračných techník EKS a tITP [59].

	Analyty	Matrica	LOD [$\mu\text{g/ml}$]	Rok vydania	Ref.
Elektrokinetický supercharging	Dopamin, adrenalín noradrenalín	Tkanivo mozgu	0,42–0,57	2015	[60]
	Tamoxifén a jeho metabolity	Krvná plazma od pacientov s rakovinou prsníka	0,03–0,05	2016	[61]
	Melamín	Práškové/tekuté mlieko	0,70	2015	[62]
	Nitrofenol, metylparabén, chlorofenol	Odpadová voda	4,89–5,30	2016	[63]
	Diklofenak, diflunisal, fenoprofén, ibuprofén, indometacín, ketoprofén, naproxén	Odpadová voda	0,05–0,18	2008	[64]
Tranzientná izotachofóreza	Br^- , NO_2^- , I^- , oxalát	Krvné sérum a ľudský moč	0,09–1,50	2004	[65]
	Methylpedrín, celiprolol, sotalol, indapamid	Ľudský moč	0,005–0,00004	2010	[66]
	Imatinib, lapatinib, erlotinib, sorafenib	Krvná plazma	16–280	2018	[67]
	Glutatión, oxidovaný glutatión	Krvná plazma	0,05–0,08	2003	[68]

2.6 Ľudské telové tekutiny

2.6.1 Moč

Moč je tvorený z 95% vody a jeho pH je v rozmedzí 5,5–7 závislé na strave jedinca. Z organických látok obsahuje hlavne ureu, kreatinin, aminokyseliny, kyselinu močovú a malé množstvo proteínov. Z anorganických látok sú zastúpené hlavne chloridové, sodné, draselné a amónne ióny. Žlté sfarbenie moču spôsobujú urochróm a urobilinogén. Pri poruche pečeni sa v moči nachádza bilirubín. Zdravý jedinec vylúči denne asi 1,5 l moču. Nežiaduce látky, ako napríklad proteíny, sú počas μ EME zadržované na rozhraní FLM, čo je dané jej selektivitou (viď kapitola 2.2.1) [69].

2.6.2 Krv

Pozostáva z krvnej plazmy (55 %) a bunkových elementov (45 %). Majoritné zastúpenie krvnej plazmy tvorí voda (90 %), zvyšok sú organické a anorganické látky. Najväčší podiel organických látok zastúpených v krvnej plazme tvoria proteíny (albumíny, globulíny a fibrinogény), enzýmy, hormóny a iné. Anorganickými zložkami môžu byť sodík, draslík, vápnik, horčík a iné. Medzi bunkové elementy sa radia erytrocyty, leukocyty a trombocyty. Prítomnosť proteínov a bunkových elementov v krvi a ich negatívny dopad na kvalitatívnu a kvantitatívnu analýzu je riešený pomocou μ EME (viď kapitola 2.2.1) [69].

2.6.3 Suché krvné bodky

Suché krvné bodky (DBS) vznikajú odobraním kvapky krvi z prstu (päty, alebo laby) jedinca, ktorá je umiestnená na zbernú kartu. Kvapka sa nadávkuje na celulózovú kartu a nechá sa uschnúť. Na analýzu je potrebný čiastočný, alebo celý výrez krvnej bodky, ktorý je potom umiestnený do vialky obsahujúcej rozpúšťadlo (voda, metanol, alebo kombinácia metanolu s vodou). Následne sa analyt eluuje z krvnej bodky a je pripravený na analýzu pomocou vhodnej separačnej techniky [70]. Dôvodom, prečo DBS naberá na popularite sú etické, ekonomické a hlavne praktické výhody. Odber narozdiel od venóznej krvi je menej invazívny a legislatívou prehlásený za bezpečný. Príklad DBS karty Whatman 903 je zobrazený na obr. 11. Hlavnou nevýhodou DBS je vplyv hematokritu na veľkosť bodky. Hematokrit je pomer erytrocytov v celom objeme krvi. Rôzne hodnoty hematokritu spôsobujú rozdielnu distribúciu sledovaných analytov na odberovej karte. Spôsobuje takzvaný „halo efekt“, ktorý negatívne pôsobí na kvantitatívnu analýzu. Medzi ďalšie nevýhody patrí napríklad nízky objem kvapky krvi, kde na analýzu tak malého množstva je potrebná citlivejšia metóda a zvyčajne na jednu kvapku je možná iba jedna analýza. Všetky spomenuté nevýhody sú aktuálne predmetom výzkumu a pretrváva snaha o ich elimináciu [70–71].



Obr. 11: Whatman 903 DBS karta [72].

2.7 Vlastnosti modelových bázičých liečiv

Lipofilita je jednou z najdôležitejších fyzikálno-chemických vlastností liečiva. Hrá úlohu v rozpustnosti, absorpcii, distribúcii, permeabilite, väzbe na plazmatické bielkoviny a iné. Najbežnejšie používanou mierou lipofilnosti je hodnota $\log P$, ktorý je zložkou Lipinského pravidla piatich. Tie hovoria o pravdepodobnosti prechodu látky cez bunečnú membránu [73]. $\log P$ je rozdeľovacím koeficientom molekuly medzi vodnou a lipofilnou fázou, zvyčajne oktanolom. Ďalšie možné vyjadrenie lipofility je pomocou $\log D$. Rozdiel oproti $\log P$ je výmena vodnej fázy za pufr o špecifickej pH hodnote. Bázičné liečivá použité v tejto diplomovej práci (nortriptylín, haloperidol, loperamid) prechádzajú do organickej fázy (FLM) bezproblémovo z dôvodu vyšších hodnôt $\log P$ [74]. Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti bázičých liečiv sú zobrazené v tab. 2.

Tab. 2. Fyzikálno-chemické a biologické vlastnosti modelových analytov [75, 76].

Analyty	Molekulová hmotnosť [g/mol]	λ_{\max} [nm]	$\log P$	pK_a	Terapeutická koncentrácia [$\mu\text{g/ml}$]
Nortriptylín	263,4	205, 239	4,51	10,47	0,02–0,2
Haloperidol	375,8	200, 248	4,30	8,66	0,005–0,017
Loperamid	477,0	200	5,50	9,41	< 0,003

2.8 Validačné parametre CE

Validácia značí súbor procesov, ktoré je potrebné uskutočniť pre overenie či je daná metóda správne nastavená a určuje v akom rozsahu je použiteľná. Hlavnou myšlienkou validácie je upresnenie validačných parametrov, ktoré je potom možné porovnávať medzi sebou v rámci rozdielnych laboratórií (zabezpečenie kvality) [77].

2.8.1 Lineárny rozsah

Je taký rozsah koncentrácií sledovaných analytov, kde sa zmena analytického signálu mení lineárne (priamoúmerne). Linearita je schopnosť analytickej metódy poskytovať odozvu v danom rozsahu, ktorá je priamo úmerná koncentrácii analytov vo vzorke. V praxi je linearita vyjadrená koeficientom spoľahlivosti R^2 . Meranie sa považuje za presnejšie čím je R^2 bližšie k hodnote rovnej jedna [77].

2.8.2 Limit detekcie a limit kvantifikácie

Limit detekcie (LOD) je daný najmenšou koncentráciou sledovaného analytu vo vzorke, ktorú je metóda schopná bezpečne detekovať ako signál odlišený od šumu. Určuje sa z hodnôt analytického signálu. Pre LOD je analytický signál (S) trikrát vyšší ako je šum základnej línie (N). Vzorec na výpočet LOD je zobrazený v rovnici č. (7) [77].

$$LOD = \frac{3S}{N}, \quad (7)$$

Limit kvantifikácie (LOQ) je najnižšie možné množstvo, ktoré sa dá spoľahlivo kvantitatívne stanoviť pomocou analytickej metódy. Pre LOQ je šum základnej línie spravidla desaťkrát nižší ako je analytický signál pozorovaného analytu. Výpočet LOQ je zobrazený v rovnici č. (8) [77].

$$LOQ = \frac{10S}{N}, \quad (8)$$

2.8.3 Rozlíšenie

Rozlíšenie je vyjadrenie miery kvality separácie dvoch susedných analytov. Vyjadruje sa ako rozdiel migračných časov delený priemernou hodnotou šírky píku. Patrí medzi bezrozmerné veličiny a vo všeobecnosti platí, čím vyššia hodnota tým lepšia separácia. Hodnota vyššia ako 1,5 je považovaná za dostatočnú hodnotu rozlíšenia. Výpočet je zobrazený v rovnici č. (9) [77].

$$R_S = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}, \quad (9)$$

kde t značí migračný čas a w zastupuje šírku píku v základni.

2.8.4 Počet teoretických poschodí

Počet teoretických poschodí kapiláry vyjadruje účinnosť separácie CE a je definovaný podľa rovnice č. (10) [48].

$$N = 5,545 \left(\frac{t_m}{w_{1/2}} \right)^2, \quad (10)$$

kde t_m je migračný čas, $w_{1/2}$ je šírka píku v polovici jeho výšky.

3 Experimentálna časť

3.1 Príprava roztokov

3.1.1 Zásobné roztoky

Základný elektrolyt (BGE):

Pre analýzu vybraných bázických liečiv bol zvolený ako základný elektrolyt kyselina octová (HAc). Zásobný roztok bol pripravený riedením HAc (99,8%; Lach-Ner, Česká republika) na výslednú koncentráciu 5 M deionizovanou vodou prečistenou iónomeničom G 7749 (Miele, Nemecko). Vzniknutý BGE bol filtrovaný cez jednorazový striekačkový filter (0,45 μm , Minisart RC 25, Nemecko). Následne bol BGE umiestnený do ultrazvuku po dobu desiatich minút. Takto pripravený roztok bol skladovaný v chladničke pri teplote 4 °C. Výsledné pH pripraveného BGE bolo 2,6.

Bázické liečivá:

Príprava bázických liečiv nortriptylin hydrochloridu, haloperidolu a loperamid hydrochloridu, (Sigma-Aldrich, Nemecko), spočívala v rozpustení pevnej navážky v metanole (Lach-Ner). Výsledná koncentrácia liečiv bola 1 mg/ml. Takto pripravené roztoky boli súhrnne zmiešané v pomere 1:1:1 a výsledná koncentrácia každého analytu bola 333 $\mu\text{g/ml}$. Vzniknutý zásobný roztok bol skladovaný v mrazničke pri teplote -20 °C.

Zaostrovací elektrolyt:

Zaostrovací elektrolyt NH_4Ac (Fluka, Nemecko) bol pripravený rozpustením pevnej substancie v deionizovanej vode, tak aby koncentrácia výsledného roztoku bola 1 M. Takto pripravený roztok bol umiestnený do ultrazvuku po dobu desiatich minút. Následne prebehlo skladovanie v chladničke pri teplote 4 °C.

Roztok chloridu sodného

Chlorid sodný (Pliva-Lachema, Česká republika) bol pripravený rozpustením pevnej fázy v deionizovanej vode na výslednú koncentráciu 1 M. Takto pripravený roztok bol umiestnený do ultrazvuku na dobu desať minút a uskladnenie prebiehalo v chladničke pri teplote 4 °C.

3.1.2 Pracovné roztoky

BGE:

Pracovný roztok BGE bol pripravený riedením zásobného roztoku (5M HAc) deionizovanou vodou na konečnú koncentráciu 300 mM HAc. Po dobu dvoch minút bol umiestnený do ultrazvuku. BGE bol vždy v deň merania čerstvo pripravený.

Bázické liečivá:

Pracovný roztok bázických liečiv bol pripravený riedením zásobného roztoku o koncentrácii 333 µg/ml každého analytu matricou na výslednú koncentráciu 1 µg/ml. Takto zhotovený pracovný roztok bol pripravovaný vždy čerstvý v deň merania.

Zaostrovací elektrolyt:

Riedením zásobného roztoku NH₄Ac (1 M) deionizovanou vodou vznikol pracovný roztok o koncentrácii 300 mM. Takto zhotovený roztok bol pripravovaný čerstvo každý deň merania.

Roztok chloridu sodného:

Koncentrácia NaCl bola 150 mM ($w = 0,9\%$), čo odpovedá koncentrácii fyziologického roztoku a vznikol riedením zásobného roztoku NaCl (1 M) deionizovanou vodou. NaCl v tejto diplomovej práci slúži na simuláciu reálnych podmienok. V deň merania bol pripravený vždy nový roztok.

3.1.3 Príprava roztokov používaných pre mikroextrakcie

Donorové roztoky:

Pre prvotné µEME pozostával donorový roztok z bázických liečiv o koncentrácii 1 µg/ml, 150mM NaCl a bol upravený okyslením vodnými roztokmi kyselín HAc a HCl na výslednú koncentráciu 0–300 mM (pH hodnoty boli 6–2,5). Vzniknutý donorový roztok bol dávkovaný v objeme 5 µl do extrakčnej jednotky. V deň merania bol daný roztok pripravený vždy čerstvý.

Ďalej boli testované roztoky reálnej matrice ľudskeho moču a kapilárnej krvi vo forme DBS. Ľudský moč obsahoval pridané bázické liečiva o výslednej koncentrácii 1 µg/ml a bol okyslený vodnými roztokmi kyselín (HCl a HAc) na výslednú koncentráciu 0–300 mM. Hodnota pH po okyslení sa pohybovala 5–3. Objem donorového roztoku pre µEME bol 2,5–10 µl. V deň merania bol donorový roztok pripravovaný vždy z čerstvej ranej neriedenej moči.

Odber kapilárnej krvi pre tvorbu DBS bol uskutočnený po vpichu perom s bodcom do bruška prstu. Miesto vpichu bolo najskôr etanolom vydezinfikované a osušené. Prvá kvapka krvi bola zotretá sterilnou gázou z dôvodu vysokého obsahu kožného tkaniva, ktoré tam po vpichu bodcom ostalo. Krvné kvapky o objeme 20 µl boli nadávkované mikropipetou z miesta vpichu do PCR mikrovialky (250 µl, Fisher scientific, USA) s predchystaným objemom 5 µl vodného roztoku bázických liečiv. Krv s roztokom liečiv bola premiešaná a 20 µl tohto roztoku bolo odpipetovaného na vzorkovacie karty (Whatman 903, Veľká Británia vid' obr. 11) a nechala sa uschnúť na okolitom vzduchu pri laboratórnej teplote po dobu šiestich hodín. Po usušení krvnej bodky bola pomocou korkovrtu (Ø 9,5 cm) vyrezaná celá bodka a umiestnená do vialky (obj. č. 5182-0567, Agilent, Nemecko). Po vložení krvnej bodky do vialky bolo pridaných 100 µl metanolu (100%, Sigma-Aldrich) a takto rozpustená vzorka bola trepaná na trepačke (Vibramax 100, Heidolph, Nemecko) po dobu jednej minúty. Potom k tomuto roztoku bolo pridaných 93,3 µl deionizovanej vody. Takto pripravený roztok

sa nechal trepať ďalších 10 min a na záver bol roztok okyslený 6,7 μl 300mM HAc, tak aby dosiahnutá výsledná koncentrácia HAc bola 10 mM. Vzniknutý roztok bol číry a bol aplikovaný do μEME .

Vzorky (moč a kapilárna krv) pochádzali od dobrovoľníkov z Ústavu analytickej chémie AV ČR, v. v.i., ktorí podpísali informovaný súhlas so spracovaním vzoriek.

Akceptorový roztok:

Ako akceptorové roztoky boli testované deionizovaná voda a vodné roztoky HAc, HCl a NaOH o konečnej koncentrácii (0–300 mM). Objem akceptorového roztoku bol 1–4 μl .

FLM:

Boli testované organické fázy 1-ethyl-2-nitrobenzen (ENB, Fluka) a 1-oktanol (Fluka). Objem dávkovania FLM sa pohyboval v rozmedzí 1–4 μl . Vzorky organických fáz boli uchovávané v uzatvárateľných vialkách bez prístupu slnečného žiarenia. Uskladnenie prebiehalo v chladničke pri 4 °C.

3.2 Príprava mikroextrakčnej jednotky

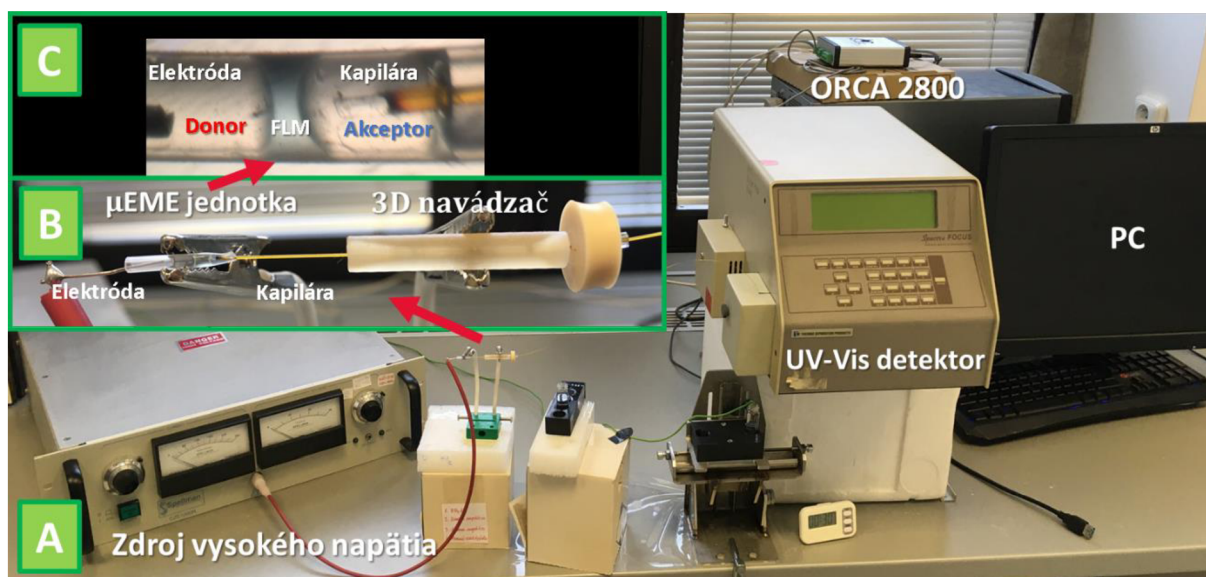
Mikroextrakčná jednotka pozostávala z výrezu PP pipetovacej špičky (0,5–10 μl , typ 959, Kartell, Taliansko). Následne pomocou mikropipét (1–10 μl , Eppendorf, Nemecko) boli do dutej časti výrezu dávkované mikrolitrové objemy jednotlivých fáz. Ako prvý bol dávkovaný donorový roztok (2,5–10 μl), potom FLM (1–4 μl) a nakoniec akceptorový roztok (1–4 μl). Do donorového roztoku bola umiestnená platínová elektróda (anóda) a inletová časť kremennej kapiláry bola umiestnená do akceptorového roztoku. Druhý koniec kapiláry bol vložený do vialky s BGE a druhou platínovou elektródou (katódou). Na elektródy bolo vkladané napätie (5–20 kV). Z takto pripravenej jednotky sa elektrokineticky dávkovali (30–120 s) analyty do kapiláry CE systému, kde boli neskôr analyzované. Správne a jednotné navedenie kremennej kapiláry do výrezu PP špičky a zaistenie opakovaného dosiahnutia fixnej polohy kapiláry voči FLM zabezpečoval 3D vytlačený navádzač. Mikroextrakčná jednotka a navádzač sú zobrazené na obr. 12.

3.3 Metóda CE-UV

Analýzy boli prevádzané pomocou laboratórnej zostavy CE-UV pozostávajúcej zo zdroja napätia Spellman CZE1000R (Spellman High Voltage, USA) a detektora Spectra Focus (Spectra-Physics, USA). Detekcia prebiehala pri vlnovej dĺžke 200 nm. Separáčnú časť tvorila kremenná kapilára (Polymicro Technologies, Phoenix, USA) zvonku pokrytá vrstvou polyimidového filmu. Vnútorňý priemer kapiláry bol 75 μm (vonkajší priemer kapiláry bol 375 μm) a celková dĺžka kapiláry bola 54,5 cm (efektívna dĺžka kapiláry činila 43,5 cm). Obidva konce kapiláry boli zbavené polyimidového filmu opálením. Rovnakým spôsobom bolo vytvorené detekčné okienko. Na inletový koniec kapiláry bolo aplikované separačné napätie o hodnote +20 kV. Napätie bolo sprostredkované pomocou dvoch 5 cm platínových elektród

(Ø 0,5 mm, Advent Technologies, Veľká Británia), ktoré boli ponorené do vialky s BGE spolu so separačnou kapilárou.

Nová kapilára bola pred separáciou premývaná po dobu 5 minút 1M NaOH, 5 minút deionizovanou vodou a následne 5 minút roztokom BGE manuálne pomocou injekčnej striekačky (5 ml, Braun, Nemecko). Na začiatku dňa bola kapilára premývaná po dobu 1 minúty 100mM NaOH, 1 minúty deionizovanou vodou a následne 1 minútou roztokom BGE. Po premytí kapiláry prebiehalo HDI NH₄Ac, dané výškovým rozdielom BGE a vzorky (30 cm), následne bola kapilára premiestnená do akceptorového roztoku μEME a prebiehalo EKS. Po jeho skončení bola kapilára premiestnená späť do vialky s BGE. Na konci pracovného dňa bola kapilára vždy premytá po dobu 1 minúty 100mM NaOH, 1 minúty deionizovanou vodou a následne bola vzduchom vysušená. Separácia prebiehala pri konštantnej laboratórnej teplote (25 °C). Bola zaznamenávaná zmena absorbancie a tento analytický signál bol prevedený pomocou digitálneho prevodníka ORCA 2800 (ECOM spol. s.r.o., Česká republika) a následne spracovaný pomocou programu ECOMAC (ECOM spol. s.r.o.). Získané dáta boli vyhodnotené za pomoci programu Clarity (DataApex, Česká republika). Celá zostava je zobrazená na obr. 12.



Obr. 12: Laboratórna zostava CE s UV-VIS detektorom a mikroextrakčnou jednotkou. A: zobrazuje CE zostavu prepojenú spolu s μEME. B: zobrazuje nastavenie μEME jednotky spolu s 3D vytlačným navádzačom kapiláry. Pre lepšiu viditeľnosť μEME jednotky bola oddelená od navádzača. C: zobrazený detail μEME jednotky naplnenými fázami a s vloženou elektródou a kapilárou.

3.4 In-line usporiadanie μEME v spojení s CE systémom

Na začiatku analýzy po preplachu (NaOH a deionizovanou vodou) ostala kapilára naplnená BGE. Následne bola zóna zaostrovacieho elektrolytu NH₄Ac dávkaná (HDI) do kremennej kapiláry po dobu 5–80 s. HDI bolo zabezpečené výškovým rozdielom hladín 30 cm.

Po nadávkovaní NH_4Ac bola kremenná kapilára vložená do akceptorového roztoku predom naplnenej extrakčnej jednotky pre μEME a dôkladne navedená pomocou 3D vytlačeného navádzača (vid'. obr. 12) k rozhraniu FLM. Pozitívna platínová elektróda bola umiestená v donorovom roztoku μEME jednotky a záporná vo vialke s BGE a vloženým outletovým koncom kapiláry. Na elektródy bolo vložené extrakčné napätie (1–20 kV), čím prebehlo EKS (30–120 s) bázických analytov priamo z donorového roztoku cez FLM do kremennej kapiláry. Po ukončení EKS boli kapilára a pozitívna elektróda osušené a vložené do vialky s obsahom BGE a nasledovala separácia pomocou CE.

4 Výsledky a diskusia

4.1 Optimalizácia separačných podmienok

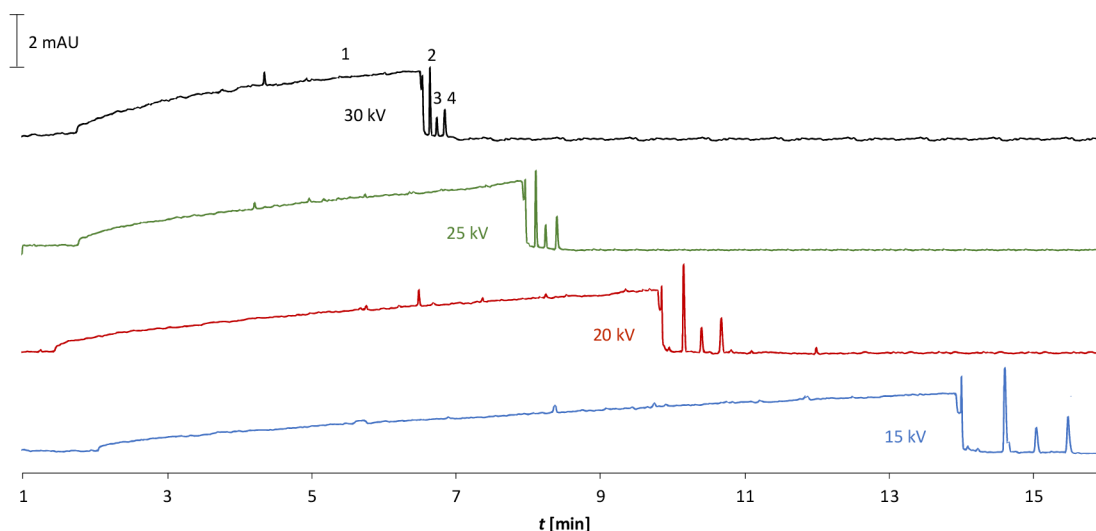
4.1.1 Výber BGE a modelových analytov

Modelové analyty bážických liečiv boli vybrané na základe ich používania v medicíne, a pretože ich terapeutické hladiny sa vyskytujú vo veľmi nízkych koncentráciách (viď tab. 2) a preto sa hľadá technika, ktorá je schopná zakoncentrovať tento typ liečiv. Ako modelové analyty boli vybrané nortriptylin, haloperidol a loperamid, ktoré majú podobné hodnoty pK_a a $\log P$. Tým bol zaistený porovnateľný transport cez FLM. S ohľadom na nich bol vybraný elektrolytový systém, ktorý je schopný ich rozseparovať.

Ako BGE bol zvolený vodný roztok HAc. Jej koncentrácia bola 300 mM. Výber BGE bol volený na základe predchádzajúcej publikácie [58] a predchádzajúcej bakalárskej práce [78]. HAc ($pK_a = 4,5$ [79]) okysľuje systém a tým zaisťuje ionizáciu bážických liečiv. Zároveň slúži aj ako terminačný elektrolyt pre tITP po prevedenom EKS (viď kapitoly 2.4.1 a 2.4.2).

4.1.2 Optimalizácia separačného napätia

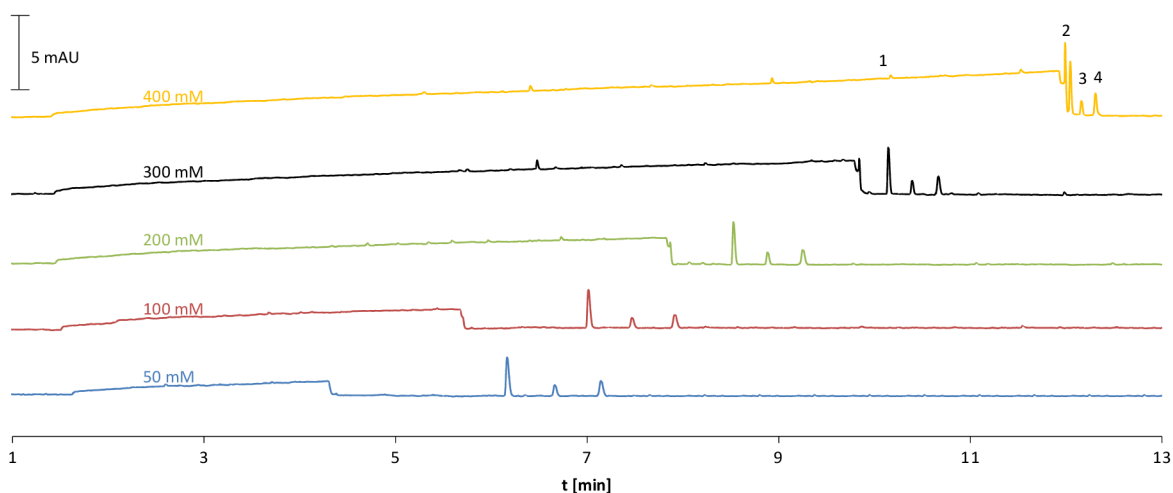
Vkladané napätie bolo testované v rozmedzí od +15 kV do +30 kV. Migrácia sledovaných analytov a zaostrovacej zóny pri +15 kV prebiehala najpomalšie. Rozlíšenie pík (medzi prvým a druhým 3,6; druhým a tretím 3,9) a zaostrenie, vyjadrené ako pomer signál/šum (S/N) nortriptylin 48,8; haloperidol 14,5; loperamid 31,8 boli dostačujúce. Pri aplikovaní +20 kV migrácia analytov prebiehala rýchlejšie, rozlíšenie pík (2,7 a 2,9) a S/N (50,2; 15,1; 20,3) bážických analytov boli dostatočné a pri použitom napätí dochádzalo k najväčšiemu zaostreniu bážických liečiv vplyvom NH_4Ac . Medzi zónou NH_4Ac a bážickými analytmi je priestor pre prípadnú migráciu balastných komponent pochádzajúcich z reálnej matrice. Pri napätí +25 kV bolo dosiahnuté dostačujúce rozlíšenie pík (2,0 a 2,3), ale potrebný priestor medzi zónou NH_4Ac a bážickými analytmi bol výrazne menší. Pomer S/N bol nižší (44,3; 13,6; 18,1), než pri separácii prebiehajúcej za napätia +15 kV a +20 kV. Separácia prebiehajúca pri napätí +30 kV je nevyhovujúca z dôvodu nízkeho rozlíšenia bážických analytov (1,4 a 1,6), aj keď separácia prebiehala najrýchlejšie. S/N pomer bážických analytov bol najmenší (39,3; 11,6; 15,5). Ďalším negatívom je, že nedochádza pri aplikovanom napätí k vytvoreniu dostatočného priestoru medzi zónou NH_4Ac a píkmi bážických liečiv pre prípadný výskyt balastných látok. Pre ďalšie experimenty bolo použité separačné napätie o hodnote +20 kV. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 13.



Obr. 13: Optimalizácia separačného napätia. Podmienky: vkladané separačné napätie 15–30 kV; (1) NH_4Ac o koncentrácii 300 mM, HDI 40 s; bázické liečivá ((2) nortriptylin, (3) haloperidol, (4) loperamid) o koncentrácii 1 $\mu\text{g/ml}$ rozpustené vo vodnom roztoku HAc (100 mM), HDI 10 s, separačné napätie 15–30 kV.

4.1.3 Optimalizácia koncentrácie zaostrovacieho elektrolytu

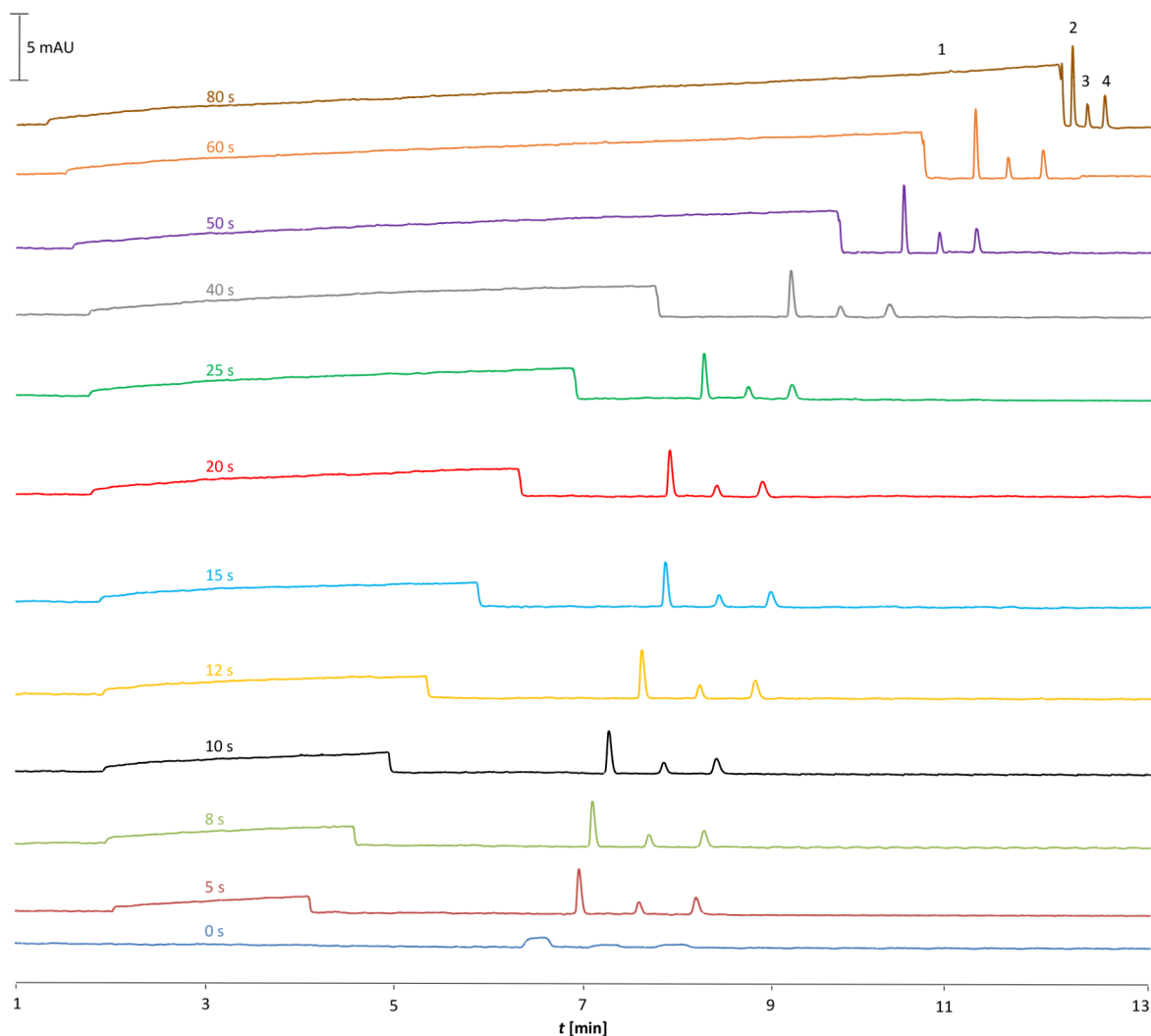
V nadchádzajúcom experimente bola optimalizovaná koncentrácia zaostrovacieho elektrolytu NH_4Ac . Merané boli koncentrácie v rozmedzí 50–400 mM. Čas HDI zóny NH_4Ac bol zachovaný pri všetkých koncentráciách rovnaký (40 s). NH_4Ac o koncentrácii 50 mM tvoril najkratšiu zónu. Pomer S/N bázických liečiv bol nízky (41,4; 12,7; 17,0). Rozlíšenie pík bázických liečiv bolo najvyššie (4,0 a 4,9). 100mM NH_4Ac nespôsovoval výraznejšie zaostrenie bázických liečiv (40,8; 11,7; 15,3) a výsledky nie sú príliš odlišné od 50mM NH_4Ac , ale rozlíšenie pík bázických liečiv sa znížilo (3,7 a 4,4). Potrebné zaostrenie NH_4Ac nastávalo až pri navýšení koncentrácie NH_4Ac na 200 mM. Pomer S/N (46,1; 14,1; 17,0) bol zvýšený oproti meraniam s 50 a 100mM NH_4Ac , naopak rozlíšenie bázických analytov sa znížilo, ale stále bolo postačujúce (3,1 a 3,5). Pri aplikovaní 300mM zóny NH_4Ac došlo k vyššiemu zaostreniu (50,2; 15,1; 20,3) analytov bázických liečiv oproti testovaným 50–200mM zónam NH_4Ac . Rozlíšenie bázických analytov sa znižovalo, ale bolo stále dostačujúce (2,7 a 2,9). Pri aplikácii všetkých týchto podmienok bol zachovaný priestor medzi zónou NH_4Ac a bázickými analytmi potrebný pre prípadný výskyt balastných látok z reálnej matrice. 400mM zóna NH_4Ac spôsobovala najvyššie zaostrenie (55,3; 16,1; 22,7) a rozlíšenie bázických analytov bolo najnižšie, ale stále dostačujúce (1,7 a 2,1), ale táto koncentrácia NH_4Ac neposkytuje potrebný priestor medzi zónou NH_4Ac a analytmi bázických liečiv. Preto najlepším výsledkom tejto optimalizácie je 300mM NH_4Ac , ktorý bol na základe výsledkov vybraný a používaný pre ďalšie experimenty. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 14.



Obr. 14: Optimalizácia koncentrácie zaostrovacieho elektrolytu NH_4Ac . Podmienky: koncentrácia (1) NH_4Ac (50–400 mM), HDI 40 s; základné liečivá ((2) nortriptylin, (3) haloperidol, (4) loperamid) o koncentrácii 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ vo vodnom roztoku HAc (100 mM), HDI 10 s; separačné napätie +20 kV.

4.1.4 Optimalizácia doby HDI zaostrovacieho elektrolytu

V tejto časti experimentu bol menený čas HDI zaostrovacieho elektrolytu NH_4Ac (0–80 s). Bez aplikácie zóny nebolo dosiahnuté žiadne zaostrenie analytov základných liečiv. Medzi dobami dávkovania zóny NH_4Ac v časoch 5–40 s nedochádzalo k výrazným rozdielom v pomere S/N (55,8–57,5; 15,28–13,3; 16,05–21,13). Rozlíšenia píkov základných liečiv so zvyšujúcou sa dobou dávkovania klesali (3,5–2,9 a 2,9–2,3). Priestor pre prípadný výskyt nechcených balastných látok sa znižoval, ale stále bol postačujúci (120–60 s). Výraznejšie zaostrenie (S/N 84,3; 25,7; 31,1) nastalo až pri dávkovaní NH_4Ac po dobu 50 s. Rozlíšenie píkov základných liečiv sa výrazne neznížilo (2,8 a 2,9). Priestor pre prípadnú migráciu balastných komponent bol znížený, ale stále dostačujúci (30 s). Dávkovaním zóny NH_4Ac po dobu 60 s bol dosiahnutý vyšší pomer S/N (86,3; 27,5; 37,0) a bolo zaznamenané zúženie priestoru medzi zónou NH_4Ac a prvým analytom (24 s) pre výskyt balastných komponent vplyvom vyššej doby dávkovania zóny NH_4Ac . Rozlíšenie píkov základných liečiv sa v prvom prípade mierne zvýšilo (3,0 a 2,7). Posledný experiment prebiehal dávkovaním zóny po dobu 80 s. Rozlíšenie analytov základných liečiv sa znížilo na hodnoty (1,7 a 2,0). Vplyvom NH_4Ac bol výsledný pomer S/N najvyšší (98,8; 29,7; 40,6). Čas pre výskyt nechcených migračných komponent bol krátky (3 s). Optimalizovaná doba dávkovania zóny NH_4Ac bola 50 s. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 15.



Obr. 15: Optimalizácia doby HDI zaostrovacieho elektrolytu. Podmienky: koncentrácia (1) NH_4Ac bola 300 mM, HDI (0–80 s); bázické liečivá ((2) nortriptylín, (3) haloperidol, (4) loperamid) o koncentracii 1 $\mu\text{g/ml}$ vo vodnom roztoku HAc (100 mM), HDI 10 s; separačné napätie +20 kV.

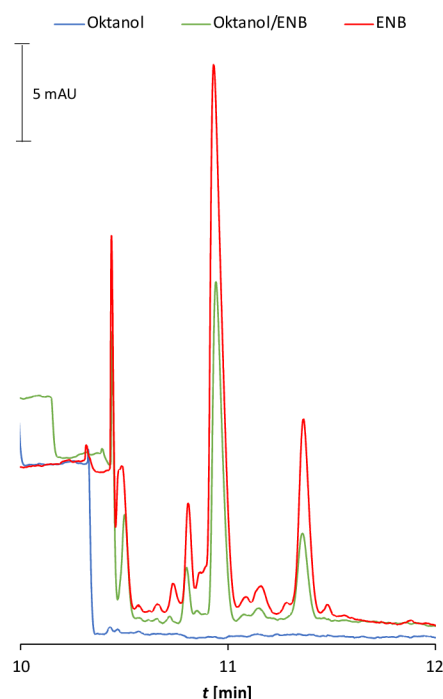
4.2 Optimalizácia extrakčných podmienok vo fyziologickom roztoku

4.2.1 Výber zloženia organickej fázy používanej pre μEME

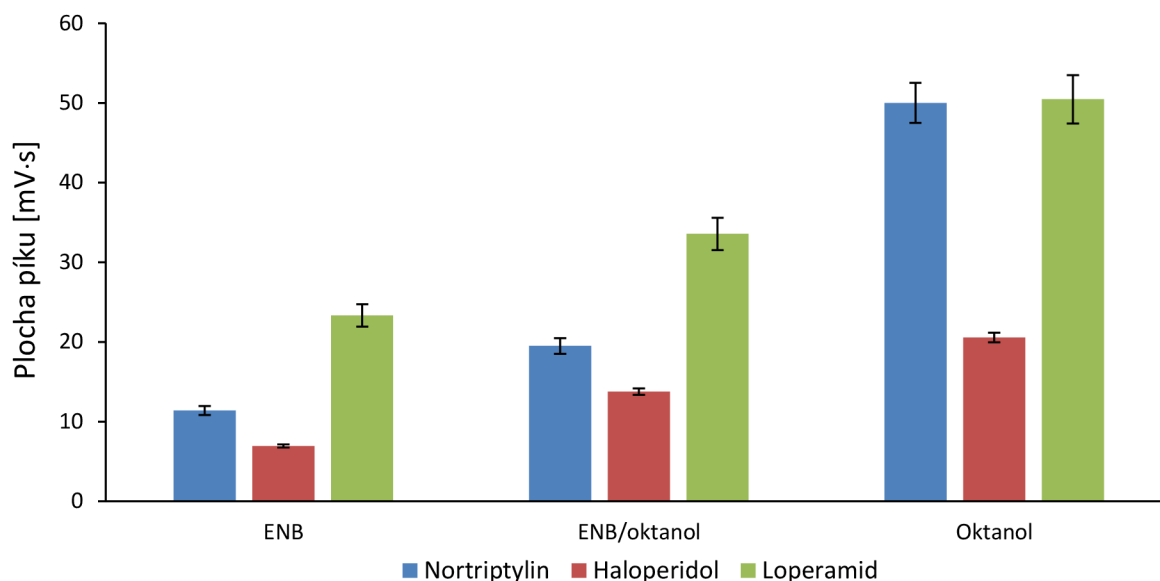
Na začiatku bolo optimalizované zloženie organickej fázy pre μEME s cieľom zabezpečiť najvyššiu selektivitu a prenos analytov bázických liečiv. Pre prvotné merania bol donorový roztok tvorený fyziologickým roztokom (150mM NaCl) v 100mM HAc bez prítomnosti bázických liečiv. Tento donor bol použitý ako slepá vzorka (blank). Fyziologický roztok simuloval prostredie reálnej matrice. Akceptorom bola 100mM HAc. Ako FLM bol vybraný ENB, oktanol a zmes ENB/oktanol v pomere 1:1. Oktanol a ENB boli vybrané na základe práce [23]. Pomer ENB/oktanol 1:1 bol následne volený pre zistenie pôvodu nežiadúcich balastných látok. Pri použití ENB dochádzalo počas μEME k prenosu nežiadúcich balastných látok z donorového roztoku a FLM prenášaných pomocou EKS do kapiláry umiestnenej v akceptorovom roztoku. Tieto látky pochádzajúce z roztoku donoru, alebo priamo z ENB majú

rovnaký migračný čas ako prvé dva analyty bázických liečiv (nortriptylin, haloperidol). Použitím zmesi oktanolu/ENB v pomere 1:1 boli získané výsledky obdobné s čistým ENB, korelujú migračné časy balastných látok, ale ich získané množstvo bolo znížené. Čistý oktanol neprepúšťal počas μ EME žiadne nadbytočné balastné látky ovplyvňujúce meranie. Preto pre ďalšie μ EME experimenty bol ako FLM vybraný čistý oktanol. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 16.

V druhej časti experimentu bola overená selektivita a priepustnosť organickej fázy pre μ EME vybraných modelových analytov. Donor obsahoval 150mM NaCl okyslený 100mM HAc a 1 μ g/ml bázických liečiv. Plochy analytov, získané z elektroforetického záznamu boli upravené odpočítaním plôch píkov balastných látok v predchádzajúcom prípade (blank) a výsledky sú zhrnuté na obr. 17. Bolo overené, že ENB ako organická fáza μ EME uvoľňuje množstvo látok s rovnakým migračným časom ako nortriptylin a haloperidol. Riedením ENB oktanolom v pomere 1:1 bola zistená nižšia plocha píkov bázických liečiv na základe čoho je možné tvrdiť, že nežiaduce látky pochádzali z ENB, alebo z NaCl, kde ENB nedokázal potlačiť prenos týchto látok. V detailnom elektroforetickom zázname blanku pri použití oktanolu ako FLM neboli prítomné žiadne ko-migrujúce látky a plochu píkov bázických liečiv v tomto experimente je možné pokladať za odpovedajúcu len analytom bázických liečiv. Pre ďalšie merania bol oktanol zvolený ako FLM z dôvodu neprítomnosti balastných látok a vyšších dosiahnutých prenosov oproti ENB.



Obr. 16: Detail záznamu porovnania uvoľňovania a prenosu balastných látok cez FLM pri použití blanku. Podmienky: FLM (2 μ l) bol oktanol, zmes oktanol/ENB v pomere 1:1 a ENB; donor (5 μ l) obsahoval 150mM NaCl, 100mM HAc bez prítomnosti bázických liečiv; akceptorom (2 μ l) bola 100mM HAc; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (50 s); separačné napätie +20 kV.



Obr. 17: Porovnanie priepustnosti FLM pre sledované analyty. Podmienky: FLM (2 μ l) bol ENB, oktanol a ENB/oktanol v pomere 1:1; donor (5 μ l) obsahoval 150mM NaCl, 100mM HAC a 1 μ g/ml bázičných liečiv; akceptorom (2 μ l) bola 100mM HAC; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (50 s); separačné napätie +20 kV.

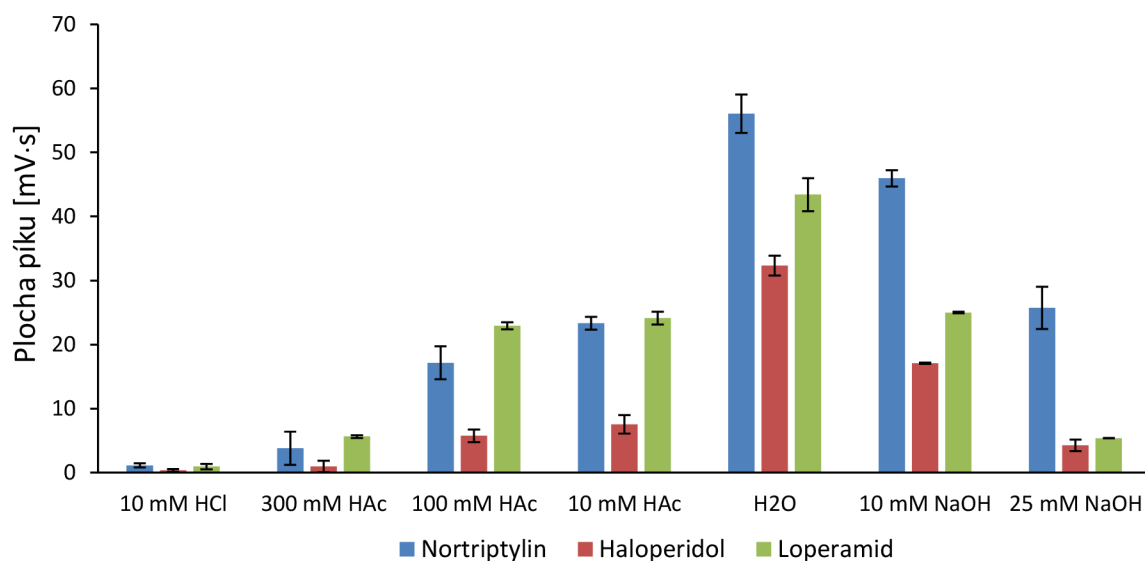
4.2.2 Vplyv zloženia akceptorového roztoku na μ EME

Donor obsahoval 150mM NaCl, bázičné liečivá o koncentrácii 1 μ g/ml, a bol okyslený HAC na 100 mM. Akceptorový roztok bol okyslený 0–300mM vodnými roztokmi kyselín (HCl a HAC), alebo alkalizovaný vodnými roztokmi NaOH (10–50 mM). Bolo predpokladané, že čím bude prostredie akceptorového roztoku menej vodivé, tým budú ionizované analyty bázičných liečiv zacentralizované priamo do kremennej kapiláry, kde už nastáva vodivé prostredie. Naopak okyslením či alkalizáciou akceptora by bola spôsobená vyššia vodivosť systému a analyty bázičných liečiv by nemali tendenciu migrovať priamo do kremennej kapiláry. Alkalizáciou akceptorového roztoku by navyše bola spôsobená deionizácia bázičných analytov a prenos by bol znížený. Vypočítané teoretické hodnoty vodivosti a hodnoty pH sú zobrazené v tab. 3. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 18. Na základe nich je možné tvrdiť, že pri silnejších (10mM HCl) a koncentrovanejších kyselinách (300mM HAC) bola vodivosť systému najvyššia (0,401 S/m pre 10mM HCl a 0,093 S/m pre 300mM HAC) za kyslých podmienok, plochy pík boli najnižšie (pre 10mM HCl 1,0; 0,36; 0,94 mV·s (pre ostatné plochy jednotky nebudú v texte značené) a 4,0; 0,96; 6,0 pre 300mM HAC). Znížením koncentrácie HAC na 100 mM sa vodivosť systému znižovala a dochádzalo k nárastu plôch pík bázičných liečiv (17,2; 5,8; 22,9). Najlepší výsledok z kyslých podmienok bol dosiahnutý pri okyslení akceptorového roztoku HAC na výslednú koncentráciu 10 mM, kedy plocha pík bázičných liečiv bola najvyššia (23,3; 7,6; 24,2) v dôsledku najnižšej vodivosti (0,016 S/m). Alkalizáciou akceptorového roztoku NaOH na výslednú koncentráciu 10 mM bola dosiahnutá vyššia vodivosť systému (0,234 S/m) aj ako v prípade HAC, ale prekvapivo plochy pík boli vyššie (45,9; 17,1; 25,0) ako v prípade použitých kyslých

podmienok. Zvýšením koncentrácie NaOH na 25 mM vodivosť systému narástla, prenos bázičných liečiv bol nižší a plocha pík bola z alkalických podmienok najnižšia (25,7; 4,3; 5,4) čo súhlasí s predpokladom. Pri vyšších koncentráciách NaOH boli znížené plochy pík bázičných liečiv na minimum (v grafe nie sú zobrazené). Prenos analytov z alkalického prostredia akceptora do prostredia kapiláry je možný z dôvodu jej umiestnenia blízko k FLM. Hodnota pH zaostrovacieho elektrolytu je voči alkalickému akceptoru nižšia čo opäť podporí ionizáciu analytov. Vzhľadom k minimálnemu priestoru medzi FLM a hranou kapiláry môže pravdepodobne dochádzať k difúznym procesom medzi prostredím akceptora a vnútorným prostredím kapiláry. Vôbec najvyššia plocha pík bázičných analytov bola dosiahnutá aplikáciou deionizovanej vody (56,1; 32,3; 43,4), kedy vodivosť systému bola najnižšia. Podrobnejší rozsah podmienok optimalizácie akceptorového roztoku bol skúšaný na reálnej matici (ľudský moč) vid' kapitola 4.3.8. Z výsledkov vyplýva, že čím bola vodivosť akceptorového roztoku nižšia a pH akceptorového roztoku sa blížilo k hodnote 6, tak prenos analytov cez FLM bol najvyšší. Preto ako akceptorový roztok bola vybraná deionizovaná voda.

Tab. 3: Vypočítané hodnoty vodivosti a pH kyselín v prostredí bez/v 150mM NaCl, pomocou programu PeakMaster.

Zloženie	Vodivosť (S/m)		pH	
	H ₂ O	+ 150mM NaCl	H ₂ O	+ 150mM NaCl
10mM HAc	0,016	1,419	3,387	3,390
100mM HAc	0,053	1,457	2,881	2,882
300mM HAc	0,093	1,498	2,641	2,642
10mM HCl	0,401	1,752	2,043	2,111
10mM NaOH	0,234	1,576	11,950	11,814
25mM NaOH	0,536	1,832	12,321	12,205
150 mM NaCl		1,402		6,964

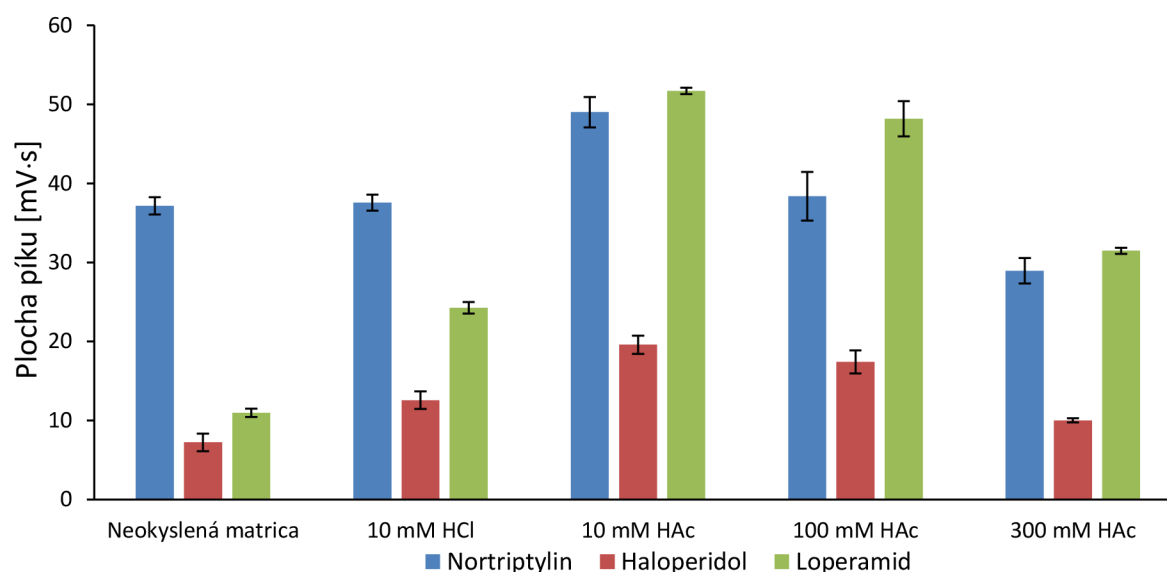


Obr. 18: Vplyv pH akceptorového roztoku na μ EME. Podmienky: akceptor (2 μ l) obsahoval roztoky o koncentracii 0–300mM HCl, NaOH a HAc; donor (5 μ l) obsahoval 150mM NaCl, 1 μ g/ml bázičických liečiv a 100mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (50 s); separačné napätie +20 kV.

4.2.3 Vplyv zloženia donorového roztoku na μ EME

V priebehu experimentu bolo menené zloženie donorového roztoku pre μ EME. Donor tvoril fyziologický roztok (150mM NaCl), bázičné liečivá (1 μ g/ml) v kyslom prostredí. Na okyslenie systému a zabezpečenie ionizácie bázičických liečiv boli použité vodné roztoky 10mM HCl a 10mM, 100mM, a 300mM HAc a donorový roztok s neokyslenou matricou. Bolo predpokladané, že čím silnejšia a koncentrovanejšia kyselina bude použitá, vodivosť donorového roztoku bude vyššia a prenos bázičických liečiv bude nižší, vid' teoretické hodnoty vodivostí a hodnoty pH v tab. 3. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 19. Výsledky potvrdili predpoklad, že čím je kyselina silnejšia, alebo koncentrovanejšia, vodivosť roztoku vzrastala, a prenos bázičických analytov klesal, zároveň platí podmienka, že donorový roztok musí byť okyslený a vodivosť vzorky je tak vyššia ako u neokyslenej matrice. Pri použití neokyslenej 150mM NaCl je vodivosť roztoku najnižšia (zo skúšaných rozsahov pH testovaných donorových roztokov) a boli dosiahnuté plochy píkov prenesených analytov (37,2; 7,2; 11,0). Okyslením donorového roztoku 10mM HCl bol spôsobený nárast vodivosti (1,752 S/m) a plochy píkov boli navýšené (37,6; 12,6; 24,3). Pre 300mM HAc bola znížená vodivosť vzorky (1,498 S/m), bol pozorovaný nižší prenos nortriptylinu (29,0), haloperidolu (10,0), ale loperamid bol prenášaný ochotnejšie (31,5). Znížením koncentrácie HAc na 100 mM bola vodivosť systému (1,457 S/m) znížená a plochy píkov bázičických liečiv (38,4; 17,4; 48,2) boli navýšené. Najvyššia plocha píkov (49,0; 19,6; 51,7) bola získaná okyslením akceptorového roztoku na finálnu koncentráciu HAc 10 mM. Zo skúšanej kyslej oblasti je vodivosť najnižšia (1,419 S/m), ale vyššia ako v prípade neokyslenej matrice. Pre ďalšie experimenty

bol donorový roztok vždy okyslený na výslednú koncentráciu 10mM HAc, čo odpovedá pH hodnote 3,5, kedy sú sledované analyty ionizované, ale vodivosť systému je spoľahlivo nízko, takže ich prenos v rámci extrakcie je dostatočne účinný.



Obr. 19: Vplyv pH donorového roztoku na μ EME. Podmienky: donor (5 μ l) obsahoval 150mM NaCl, 1 μ g/ml bázičkových liečiv a HAc 0–300mM, alebo 10mM HCl; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptor bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (50 s); separačné napätie +20 kV.

4.2.4 Zhrnutie optimalizovaných podmienok pre fyziologický roztok

V prvom rade boli optimalizované podmienky pre fyziologický roztok, ktorý slúžil ako simulácia reálnych matric, pre výber základných podmienok. Ako FLM bol vybraný oktanol, ktorý neprepúšťal žiadne ko-migrujúce látky a bol najlepšou voľbou zo skúšaných organických činidiel (výsledky vid' 4.2.1). Podmienka pre akceptorový roztok bolo dosiahnutie čo najnižšej vodivosti a zároveň ionizácie bázičkových analytov. Túto podmienku spĺňala deionizovaná voda (výsledky vid' 4.2.2). Donorový roztok μ EME bol okyslený na výslednú koncentráciu HAc 10 mM, pri ktorých boli splnené podmienky dostatočne kyslého prostredia pre ionizáciu bázičkových analytov, nízka vodivosť a zároveň toto okyslenie poskytovalo najvyšší prenos bázičkových liečiv (výsledky vid' 4.2.3).

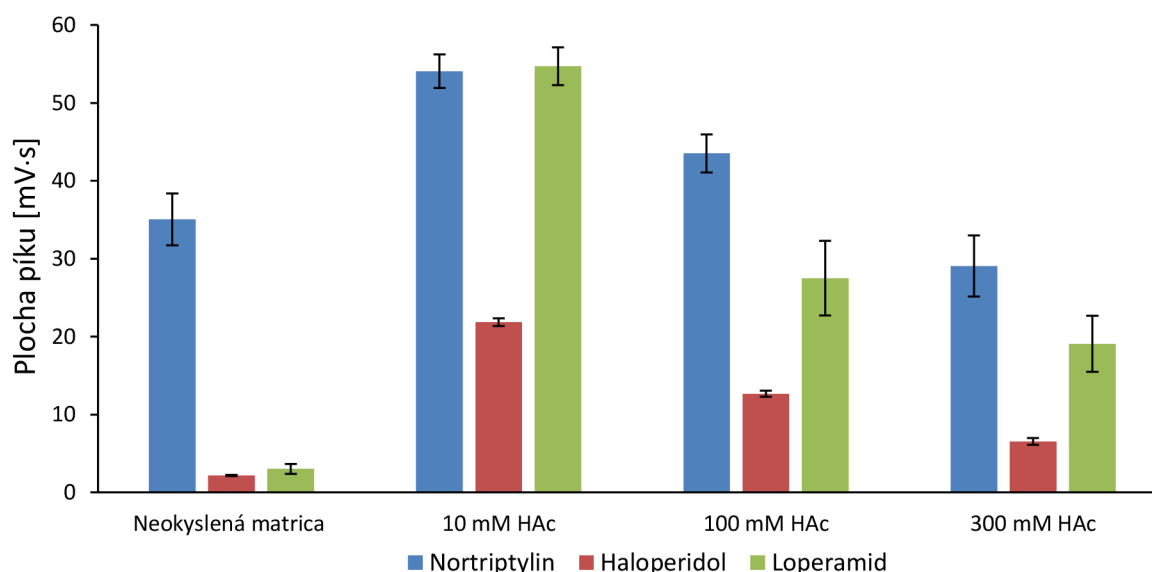
4.3 Aplikácia μ EME na reálnu matricu – ľudský moč

Podmienky optimalizované vo fyziologickom roztoku boli vzaté a odskúšané na reálnej vzorke ľudského moču bez obsahu bázičkových liečiv pre overenie zadržania nechcených matričných komponent aj pre túto reálnu matricu. Elektroforegram blanku vid' obr. 28.

4.3.1 Vplyv zloženia reálnej matrice na μ EME

Ďalšie experimenty boli prevádzané s ľudským močom s obsahom bázičkových liečiv (1 μ g/ml), okyslený pomocou vodného roztoku HAc na výslednú koncentráciu 0–300 mM (pH hodnoty

okysleného moču boli 5–3). Akceptorovým roztokom bola deionizovaná voda. HDI zóny NH_4Ac bolo znížené na 40 s z dôvodu zabezpečenia priestoru medzi zónou NH_4Ac a píkmi bázičných analytov. Výsledky sú zobrazené na obr. 20. Na základe predchádzajúceho merania (viď kapitola 4.2.3) bolo predpokladané podobné správanie sa systému. Koncentrovanejšou kyselinou (300mM HAc) je spôsobená vyššia vodivosť systému, v dôsledku čoho prenos analytov cez FLM bol najmenší (plocha pík 29,1; 6,5; 19,1). Znížením koncentrácie HAc na 100 mM sa zvýšila hodnota pH a vodivosť prostredia sa znižovala, plochy pík boli navýšené (43,5; 12,7; 27,5). Najvyššie plochy pík bázičných liečiv (54,1; 21,9; 54,7) vychádzali pri okyslení donorového roztoku na výslednú koncentráciu HAc 10 mM, kedy vodivosť systému bola najnižšia. Pri neokyslení donorového roztoku s obsahom reálnej matrice boli dosiahnuté najnižšie plochy pík (35,1; 2,2; 3,0). To mohlo byť spôsobené nižšou ionizáciou bázičných analytov z dôvodu prirodzeného pH moču. Výsledky potvrdili úvodný predpoklad, ktorý bol vytvorený na základe výsledkov optimalizácie prebiehajúcej vo fyziologickom roztoku (viď kapitola 4.2.3), že menej vodivé prostredia poskytujú najvyššie prenosy bázičných liečiv, ale zároveň musí byť zachovaná podmienka pre minimálne okyslenie donorového roztoku (10mM HAc). Pre ďalšie optimalizácie bol donorový roztok okyslený na finálnu koncentráciu HAc 10 mM a jeho pH bolo 4.

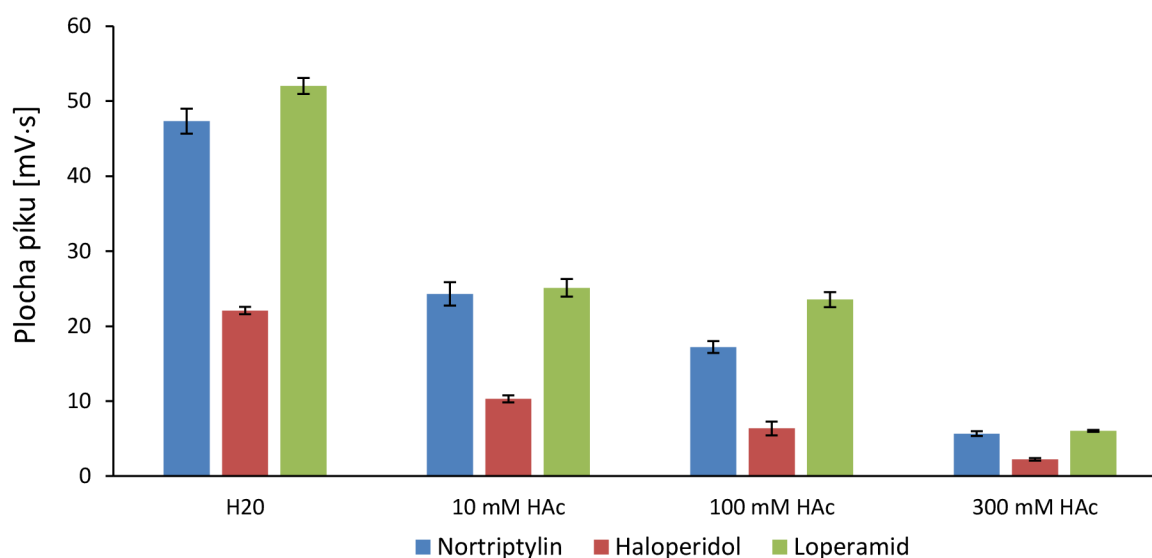


Obr. 20: Vplyv pH donorového roztoku s obsahom reálnej matrice (ľudský moč) na μEME . Podmienky: donor (5 μl) obsahoval ľudský moč, 1 $\mu\text{g/ml}$ bázičných liečiv a 0–300mM HAc; FLM (2 μl) bol oktanol; akceptor (2 μl) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.2 Vplyv zloženia akceptorového roztoku na μEME

Donor bol tvorený neriedeným ľudským močom obsahujúci 1 $\mu\text{g/ml}$ bázičných liečiv a HAc o výslednej koncentrácii 10 mM. Akceptor bol zložený z vodných roztokov HAc o koncentráciách 0–300 mM. HCl nebola zaradená do experimentu z dôvodu nízkych prenosov

bázických analytov (viď kapitola 4.2.2). Výsledky sú zobrazené na obr. 21. Výsledky odpovedajú trendu, ktorý bol zaznamenaný v predchádzajúcej optimalizácii vo fyziologickom roztoku. S vyššou kyslosťou (300mM HAc) prostredia akceptorového roztoku vzrástla vodivosť prostredia a hodnota pH sa znížila. Prenos bázických liečiv bol najnižší (5,7; 2,2; 6,0) pre 300mM HAc. Pri nižších koncentráciách HAc boli získané lepšie prenosy bázických liečiv cez FLM v dôsledku nižšej vodivosti akceptorového roztoku, aj napriek tomu, že pH tohto roztoku mierne vzrástlo. Prenos bázických liečiv za týchto podmienok sa zvýšil (plochy píkov 24,3; 10,3; 25,1). Aplikáciou deionizovanej vody, ktorá ma najnižšiu vodivosť bolo dosiahnutých najvyšších prenosov (plochy píkov 47,3; 22,1; 52,0) cez FLM do kremennej kapiláry. Hodnota pH deionizovanej vody bola okolo 6. Pre ďalšie optimalizácie bol ako akceptorový roztok za použitia reálnych matric zvolená deionizovaná voda. Pre pokračovanie a hľadanie podmienok boli odskúšané tieto základné podmienky, ktoré boli ďalej doplnené o alkalické prostredie akceptorového roztoku (viď kapitola 4.3.8).

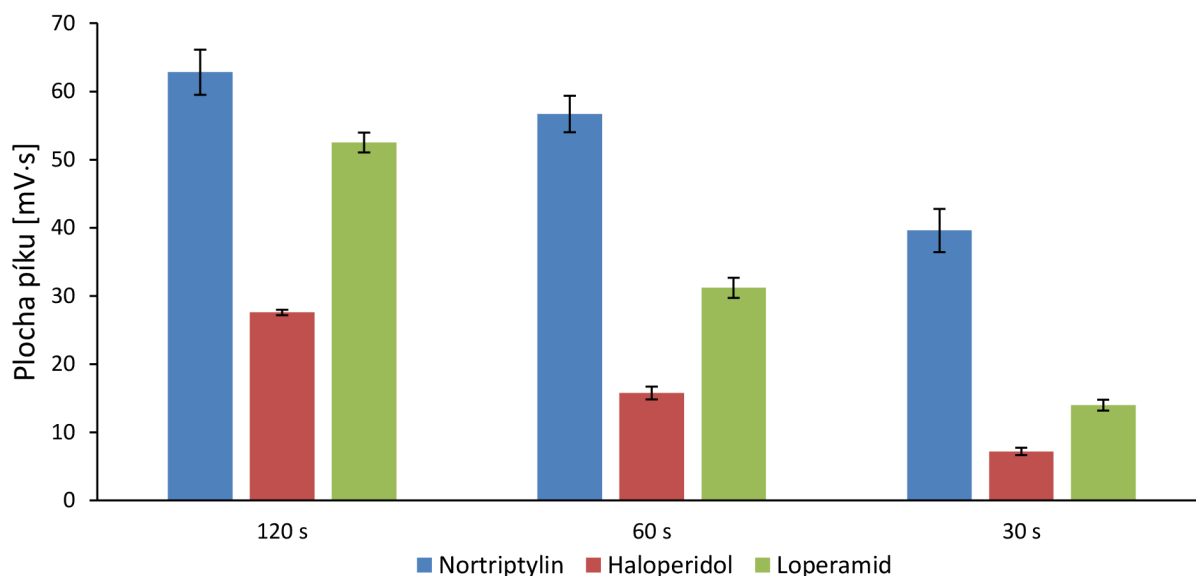


Obr. 21: Vplyv okyslenia akceptorového roztoku na μ EME s obsahom reálnej matrice (ľudský moč) Podmienky: donor (5 μ l) obsahoval ľudský moč, 1 μ g/ml bázických liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptor (2 μ l) vodné roztoky HAc (0–300 mM); EKS (2 min, 10 kV); zóna NH₄Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.3 Optimalizácia doby EKS dávkovania

Čas dávkovania bol skúšaný v rozmedzí 30–120 s. Experiment prebiehal za použitia reálnej matrice (ľudský moč), upravenej podľa podmienok (viď kapitola 3.1.3). Akceptorom bola deionizovaná voda. So zvyšujúcim časom EKS dávkovania bol očakávaný vyšší prechod analytov bázických liečiv (vyššie plochy a výšky píkov). Pri EKS dávkovaní počas 30 s bol transport bázických analytov cez FLM najmenší, plocha píkov bola (39,6; 7,2; 14,0) a výška píkov bola najmenšia (12,1; 3,4; 5,4). Zvýšením času EKS dávkovania (60 s) bol pozorovaný nárast plochy píkov (56,7; 15,8; 31,2) aj výšky píkov (15,2; 4,0; 6,8). Najvyšší

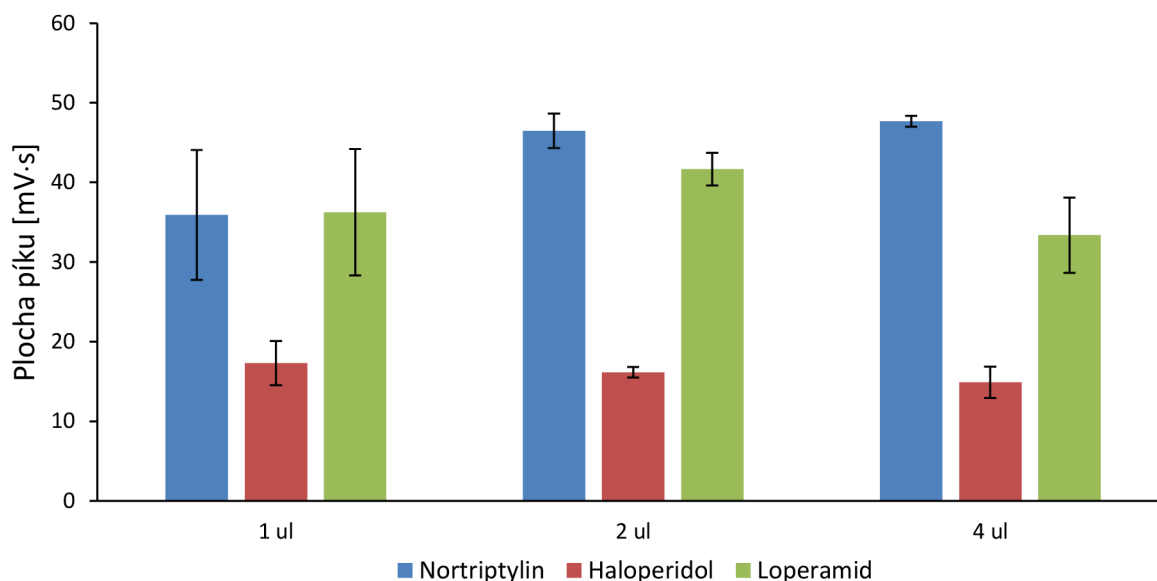
prenos bázičkých analytov bol zaznamenaný pri EKS dávkovaní 120 s. Plocha píkov bola najvyššia (62,8; 27,6; 52,5) a výška píkov bola mierne zvýšená (15,8; 5,6; 8,5) oproti 60 s. Dávkovanie 2 minút zabezpečilo najvyššiu výšku píkov, kde dlhší čas EKS dávkovania už nemal zmysel, pretože výška píkov nebola navýšená, ale dochádzalo k rozširovaniu píkov a ich prekryvu (ko-migrácii). Výsledky a podmienky experimentu sú zobrazené na obr. 22.



Obr. 22: Optimalizácia doby EKS dávkovania. Podmienky: čas EKS dávkovania (30–120 s); donor (5 μ l) obsahoval moč, 1 μ g/ml bázičkých liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptor bola deionizovaná voda; EKS 10 kV; zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.4 Optimalizácia objemu FLM pre μ EME

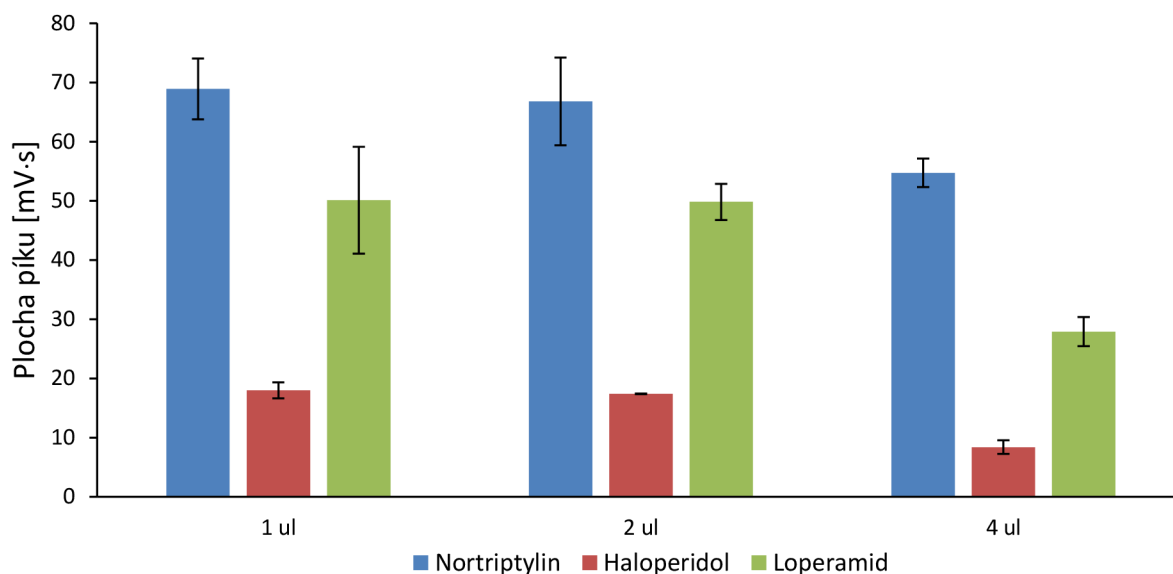
Optimalizovaný bol objem FLM v rozsahu 1–4 μ l. Meranie prebiehalo s reálnou maticou (ľudský moč) upravenou podľa podmienok (viď kapitola 3.1.3). Akceptorom bola deionizovaná voda. Očakávalo sa, že čím bude aplikovaný objem FLM nižší, tým bude migrácia bázičkých analytov prebiehať ochotnejšie a za vyšších prenosov. Extrakcia prebiehajúca s FLM o objeme 1 μ l tento predpoklad nepotvrdila. Plocha píkov bázičkých liečiv bola najnižšia (35,9; 17,3; 36,3). Systém sa choval nestabilne, v priebehu extrakcie vznikol v tenkej zóne FLM nepatrný vír, ktorý umožňoval prechod balastných látok do akceptorového roztoku. Zvyšujúcim sa objemom (2 μ l) FLM bola zabezpečená stabilita μ EME a transport bázičkých analytov bol najvyšší (46,5; 16,2; 41,7). Ďalším navýšením aplikovaného objemu na 4 μ l bol spôsobený menší nárast nortriptylinu (47,7) a plochy píkov haloperidolu a loperamidu boli znížené (14,9 a 33,4). Loperamid a jeho rozdielny transport cez FLM môže byť spôsobený rozdielnou hrúbkou FLM, kde pri vyšších objemoch bol prenos tohto liečiva nižší. Pre ďalšie merania bol výsledný objem FLM zvolený na 2 μ l. Pri tejto hodnote je zaistená stabilita pri prenosoch a dosiahnuté plochy píkov sú najvyššie. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 23



Obr. 23: Optimalizácia objemu FLM. Podmienky: FLM (1–4 µl) bol oktanol; donor (5 µl) obsahoval ľudský moč, 1 µg/ml bázických liečiv a 10mM HAC; akceptorom (2 µl) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH₄Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.5 Optimalizácia objemu akceptorového roztoku

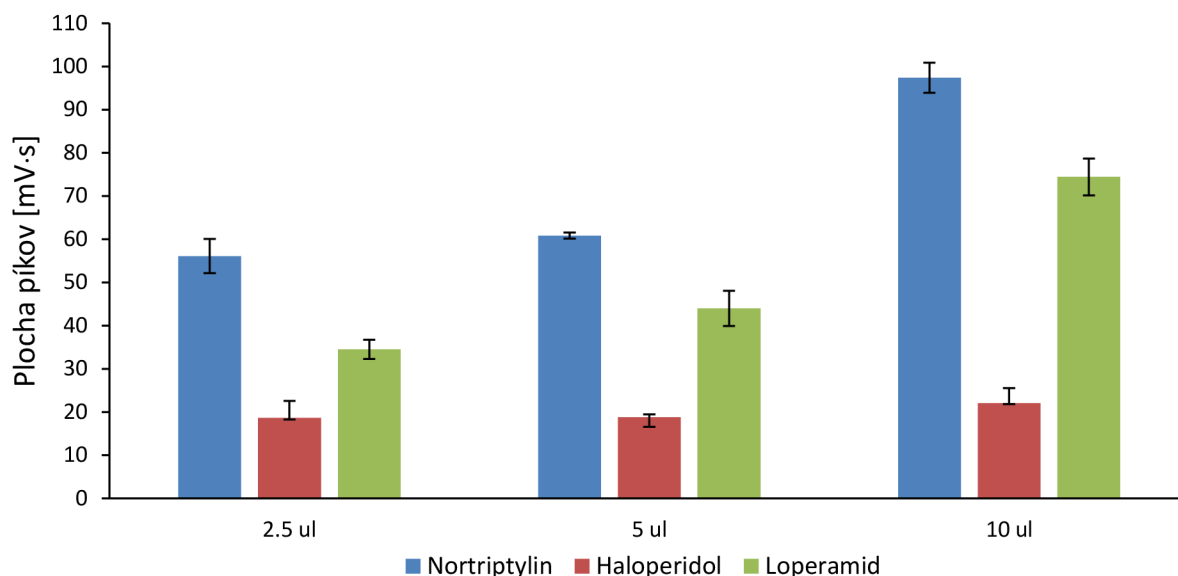
Akceptorový roztok bol dávkaný do µEME jednotky v rozsahu objemov 1–4 µl. Donorový roztok pozostával z ľudskej moči obsahujúcej bázické liečivá o konečnej koncentrácii 1 µg/ml a 10mM HAC. Bolo predpokladané, že čím menší objem akceptorového roztoku bude, tým bude kapilára bližšie k rozhraniu s FLM, tým bude zaistený menší priestor na difúzne procesy a to zaistí lepší prenos bázických analytov. Experimentálne výsledky sú zobrazené na obr. 24. Najmenšie hodnoty plochy pík bázických liečiv (54,7; 8,4; 27,9) boli získané pri dávkovaní akceptorového roztoku o objeme 4 µl. Znížením objemu akceptorového roztoku (1–2 µl) bol pozorovaný mierny nárast plochy pík bázických liečiv (68,9 a 66,8; 18,0 a 17,4; 50,1 a 49,8), kde najvyšší rozdiel plochy medzi týmito experimentmi dosahoval 3%. Na základe experimentálnych dát je možné konštatovať, že objem akceptorového roztoku µEME je dostatočne nízky už pri 2 µl a plocha pík sa so znižujúcim objemom výrazne nemenila. Pre ďalšie experimenty bol objem akceptora optimalizovaný na 2 µl. Objem 1 µl nebol zvolený z dôvodu obtiažného zaistenia potrebnej pozície kapiláry v tak malom objeme čo nebol problém pri vyšších objemoch (2 a 4 µl).



Obr. 24: Optimalizácia objemu akceptorového roztoku. Podmienky: Akceptor (1–4 μ l) bola deionizovaná voda; donor (5 μ l) obsahoval moč, 1 μ g/ml bázických liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.6 Optimalizácia objemu donorového roztoku μ EME

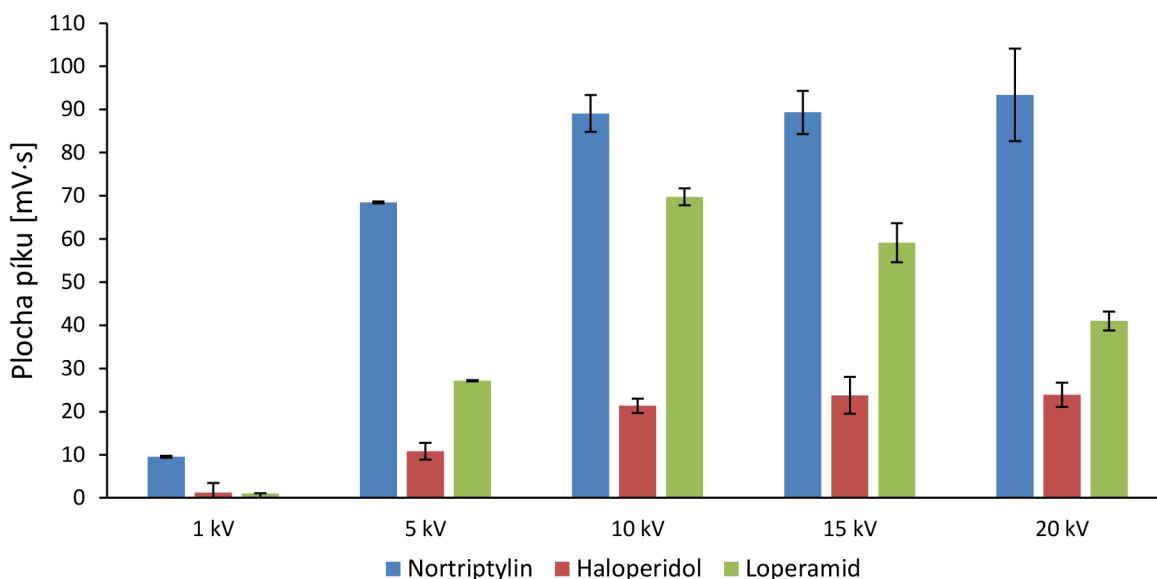
Experimentálne skúšaný rozsah objemu donorového roztoku bol v rozmedzí 2–10 μ l. Bol očakávaný nárast transportu bázických liečiv so zvyšujúcim sa objemom donorového roztoku. Tento predpoklad bol experimentálne overený. Pri dávkovaní 2,5 μ l donorového roztoku do μ EME bolo dosiahnutých najnižších prenosov (plochy píkov 56,1; 18,6; 34,5). Dávkovaním objemu 5 μ l do μ EME bolo dosiahnutých podobných hodnôt plochy pík (60,8; 18,8; 44,0) ako v prípade 2,5 μ l. Najvyššie plochy pík (97,4; 22,0; 74,4) boli dosiahnuté dávkovaním donorového roztoku o objeme 10 μ l. Pre ďalšie experimenty bol objem donorového roztoku stanovený na 10 μ l a bola potvrdená prvotná úvaha o zväčšujúcom sa prenesenom množstve bázických liečiv so zvyšujúcim sa objemom donorového roztoku. V súčasnom experimentálnom usporiadaní nebolo možné použiť väčší objem donorového roztoku, ale očakáva sa, že ďalším navýšením objemu by mohli plochy pík narastať. Výsledky experimentu sú zobrazené na obr. 25.



Obr. 25: Optimalizácia objemu donorového roztoku μ EME. Podmienky: donor (2,5–10 μ l) obsahoval ľudský moč, 1 μ g/ml bázičkových liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol použitý oktanol; akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.7 Optimalizácia extrakčného napätia μ EME

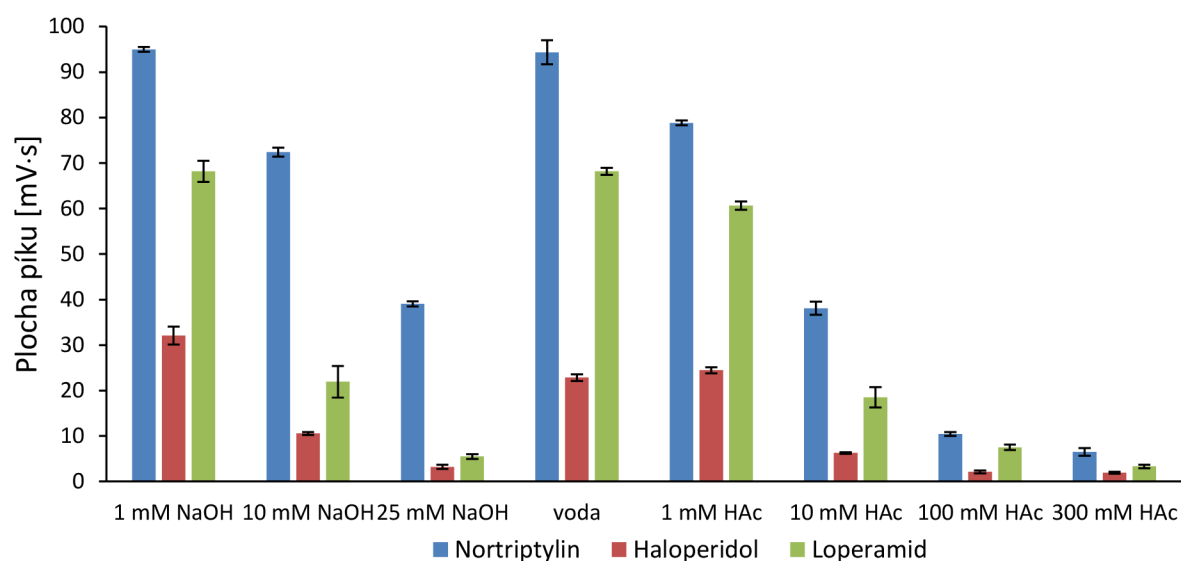
Bolo optimalizované napätie v rozsahu 1–20 kV. Donorový roztok obsahoval ľudský moč, bázičné analyty o koncentrácii 1 μ g/ml a 10mM HAc. Akceptorom bola deionizovaná voda. Bolo predpokladané, že čím väčšie extrakčné napätie bude na elektródy aplikované, tým bude transport bázičkových liečiv prebiehať rýchlejšie a v konečnom dôsledku sa preniesie vyššie množstvo bázičkových analytov za rovnaký čas. Výsledky sú zobrazené na obr. 26. Napätie o hodnote +1 kV spôsobovalo najpomalšiu migráciu ionizovaných bázičkových liečiv. Tým bola zapríčinená najnižšia plocha píkov bázičkových analytov (9,5; 1,2; 1,0). Zvyšovaním extrakčného napätia bolo zaistené postupné navyšovanie plôch píkov bázičkových liečiv vplyvom rýchlejšej migrácie bázičkových liečiv. Najvyššie plochy píkov boli získané pri extrakčnom napätí +10 kV (89,1; 21,4; 69,8). Ďalšie zvyšovanie napätia +15 kV (89,3; 23,8; 59,1) a +20 kV (93,4; 23,9; 41,0) nemalo zmysel. Tieto hodnoty napätia sa ukázali ako nestabilné a to z dôvodu vznikajúceho víru v zóne FLM zapríčineného rýchlou migráciou analytov cez FLM a spolu s nimi boli vťahované aj niektoré balastné komponenty. V tomto rozmedzí napätí stabilita a opakovateľnosť systému klesala. Preto ako najstabilnejšie extrakčné napätie pre ďalšie experimenty bola vybraná hodnota +10 kV. Pri tomto napätí bola zaistená opakovateľnosť meraní aj ich stabilita ($\text{RSD} \leq 8\%$).



Obr. 26: Optimalizácia extrakčného napätia. Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval moč, 1 μ g/ml bázických liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptor bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.8 Optimalizácia finálnych podmienok pre aplikácie μ EME na ľudský moč

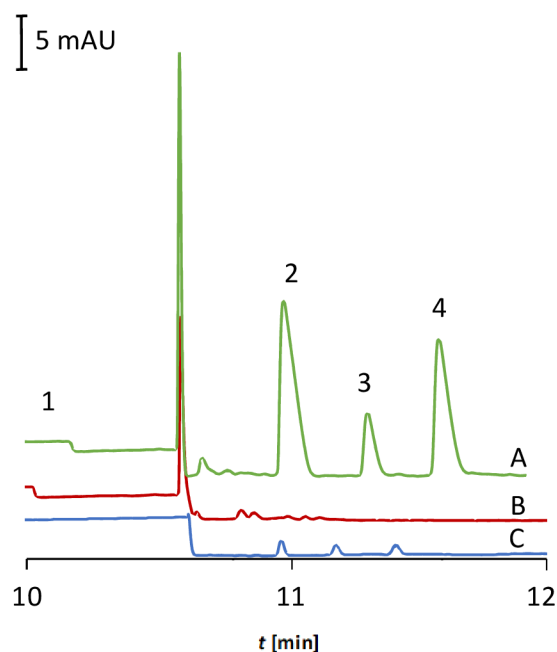
Na záver boli všetky vybrané optimálne podmienky aplikované do jedného experimentu, na otestovanie chovania reálnej matrice pri μ EME a nájdení optimálnych podmienok a zloženia akceptorovej fázy, ako jeden z kľúčových parametrov k dosiahnutiu vysokoúčinnnej extrakcie. Tu bol podrobnejšie odskúšaný alkalizovaný akceptorový roztok. Obsah donoru tvoril ľudský moč, bázické liečivá o koncentrácii 1 μ g/ml a 10mM HAc. Akceptorový roztok obsahoval vodné roztoky HAc, alebo NaOH o výsledných koncentráciách 0–300 mM. HCl nebola do tohto experimentu zahrnutá z dôvodu vyššej vodivosti spôsobujúcej nižšiu účinnosť μ EME (viď kapitola 4.2.2). Na základe týchto výsledkov merania bolo predpokladané podobné správanie sa systému. Výsledky sú zobrazené na obr. 27. Výsledky potvrdili podobné správanie systému, aké bolo pozorované pri optimalizácii akceptorového roztoku so 150mM NaCl (viď obr. 18). Všeobecne pri znižovaní koncentrácie pridaných látok dochádzalo k navyšovaniu prenosu analytov. Pri zvyšovaní koncentrácie kyseliny a hydroxidu v akceptorovom roztoku dochádzalo k zhoršeniu prenosu z dôvodu vyššej vodivosti. Najlepšie výsledky experimentu boli dosiahnuté aplikáciou akceptorových roztokov o najnižších koncentráciách 1mM NaOH, 1mM HAc a deionizovaná voda a medzi jednotlivými meraniami nie je podstatný rozdiel. Prenos bázických analytov v alkalickom prostredí je vysvetliteľný obdobne ako v kapitole 4.2.2, difúznymi procesmi na rozhraní kapilára-FLM, kde pre nízko koncentrované roztoky akceptoru sa tento efekt prejavil ešte viac, čo spôsobilo zanedbateľné rozdiely medzi 1mM HAc, NaOH a deionizovanou vodou. Ako finálny akceptorový roztok bola zvolená deionizovaná voda, ktorá poskytla plochy pík 94,4; 22,8; 68,2 z dôvodu zachovania čo najjednoduchšieho zloženia akceptorového roztoku bez obsahu sodíkových iónov, ktoré by mohli ovplyvniť priebeh analýzy.



Obr. 27: Vplyv pH akceptorového roztoku na μ EME obsahujúcu reálnu maticu. Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval ľudský moč, 1 μ g/ml bázičných liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; Akceptorom (2 μ l) boli vodné roztoky 0–300mM NaOH a HAc; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.3.9 Zhrnutie optimálnych podmienok pre ľudský moč

Reálnou biologickou vzorkou slúžiacou pre obširnejšie optimalizácie bol ľudský moč s pridaným obsahom 1 μ g/ml bázičných liečiv. Donorový roztok poskytoval najväčšie výťažky prenosu, keď bol okyslený HAc na finálnu koncentráciu 10 mM. Ako najvýhodnejšie akceptorové prostredie sa osvedčilo použitie deionizovanej vody. EKS dávkovanie prebiehalo najefektívnejšie po dobu 2 minút. Objemy jednotlivých fáz μ EME boli optimalizované nasledovne: donor 10 μ l, FLM 2 μ l a akceptor 2 μ l. Extrakčné napätie bolo z hľadiska stability, extrakčného času a intenzity prenosu najlepšie pri 10 kV. Tieto optimalizácie zabezpečili najvyššie prenosy bázičných liečiv počas μ EME. Na obrázku obr. 28 je možné vidieť elektroforegramy zobrazujúce porovnanie (pri optimalizovaných podmienkach) HDI vodného roztoku štandardu a EKS blank moču a vzorky moču s pridaným obsahom liečiv. Oproti HDI štandardu došlo pri μ EME a následnom EKS k zakoncentrovaniu analytov (7–25 krát). Zároveň oproti klasickým EME a μ EME bola dosiahnutá časová úspora, kde extrakcia bázičných liečiv v spojení s dávkovaním do kapiláry trvala len 2 minúty, pričom klasické extrakcie zvyčajne trvajú okolo 5–30 minút. Tieto optimalizované podmienky boli vzaté a aplikované na iný druh komplexnej matrice – kapilárnu krv vo forme suchých krvných bodiek.



Obr. 28: Elektroforegram neriedeného ľudského moču (EKS) a štandardu (HDI). Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval neriedený ľudský moč s/bez 1 μ g/ml bázičných liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV. Podmienky pre štandard: zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); 1 μ g/ml bázičných liečiv v deionizovanej vode (10 s, výškový rozdiel 30 cm). A - neriedený ľudský moč s 1 μ g/ml bázičných liečiv a 10mM HAc, B - blank neriedený ľudský moč a 10mM HAc, C - štandard bázičných liečiv 1 μ g/ml v deionizovanej vode. 1 - NH_4Ac , 2 - nortriptylin, 3 - haloperidol, 4 - loperamid.

4.3.10 Pracovný rozsah a linearita metódy

Donor μ EME obsahoval moč, bázičné liečivá o koncentracii (0,1–4 μ g/ml) a 10mM HAc. FLM bol oktanol a akceptorom bola deionizovaná voda. Boli vypočítané LOD a LOQ (viď kapitola 2.8.1). RSD pre plochu píkov bola vzatá z piatich meraní pre koncentráciu bázičných liečiv 1 μ g/ml. Jej hodnoty nie sú väčšie ako 10%. Vypočítané hodnoty LOD, LOQ, RSD a koeficient spoľahlivosti sú zobrazené v tab. 4.

Tab. 4: Vypočítané validačné parametre μ EME-CE. Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval moč, bázické liečivá o koncentrácii (0,1–4 μ g/ml) v 10mM HAc. FLM (2 μ l) bol oktanol a akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

	Nortriptylin	Haloperidol	Loperamid
LOD [μ g/ml]	0,006	0,024	0,041
LOQ [μ g/ml]	0,022	0,081	0,136
RSD [μ g/ml]	3,7	8,3	10,0
R^2	0,9976	0,9961	0,9924

4.4 Aplikácia μ EME na analýzu suchých krvných bodiek

4.4.1 Aplikácia optimalizovaných podmienok na suché krvné bodky

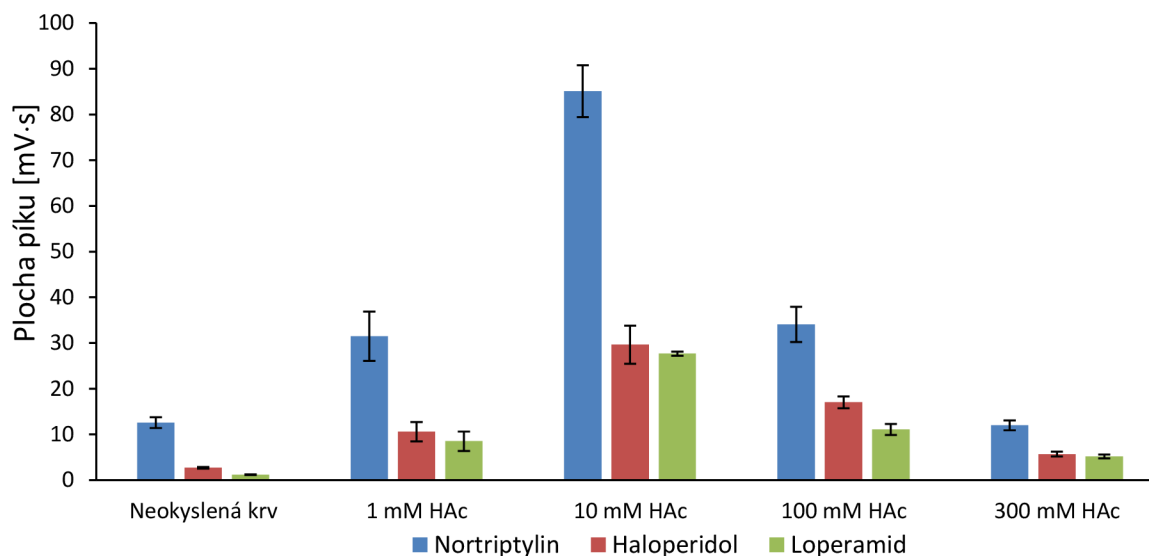
Ďalšou skúšanou maticou bola kapilárna krv vo forme DBS. Tá je z pohľadu analýz bázických (aj iných) liečiv touto technikou zaujímavá a táto forma krvi je v popredí záujmu súčasných vývojov analytických techník. Pridaním liečiv do krvi bola zaistená ich potrebná koncentrácia v donorovom roztoku. Celá bodka DBS s obsahom bázických liečiv bola vyrezaná pomocou kruhového vrtáku o priemere 9,5 cm a bola umiestnená na dno vialky pomocou pinzety. Veľkosť vyrezávanej karty Whatman 903 bola zvolená tak, aby výrez bodky presne zapadol do vialky. Výrez celej bodky zaistil potlačenie vplyvu hematokritu majúceho vplyv na nehomogénnu distribúciu analytov a množstvo matrice. Koncentrácia liečiv pridaná do DBS bola volená tak, aby po elúcii DBS v konečnom objeme 200 μ l (pri predpokladanej úplnej elúcii z DBS) bola 1 μ g/ml. K DBS umiestnenej na dne vialky bolo pridaných 100 μ l 100% metanolu a roztok sa pretrepával po dobu 1 minúty. Táto úprava zaistila, že eluát bol číry a bez krvných proteínov a krvných farbív, ktoré zostali zachytené v celulózovej štruktúre vzorkovacej karty. Deproteinácia vzorku 100% metanolom po dobu 1 minúty je nutný krok predúpravy komplexnej matrice, aby nedochádzalo pri μ EME ku zníženiu reprodukovateľnosti a destabilizácie extrakcie. Tie vznikajú v dôsledku vytvorenia zúženého vírového kanálu vo FLM, ktorý by potom umožnil prienik neprečistenej matrice do akceptorovej fázy a následne do separačnej kapiláry. Po elúcii metanolom bola pridaná deionizovaná voda a roztok bol pretrepávaný po dobu 10 minút a na záver bol eluát okyslený na výslednú koncentráciu HAc 10 mM (pH výsledného eluátu bolo 4). Prídavkom vodnej fázy boli zaistené podmienky, pri ktorých nedochádzalo k destabilizácii FLM v dôsledku príliš vysokej koncentrácie metanolu. Záverečné okyslenie HAc zaistilo ionizáciu analytov. Tento postup prípravy vzorky bol prevzatý a upravený na základe práce [80].

Vzorky ľudskej kapilárnej krvi bez prídavku liečiv (vo forme DBS) boli použité ako slepá vzorka. V migračných časoch analytov neboli detekované žiadne analytické signály, ktoré by preukazovali ko-migráciu ďalších látok. Výsledné elektroforegramy analytov DBS

sú zobrazené na obr. 30. Záznam demonštruje elúciu slepej vzorky a vzorky DBS s prídavkom 1 µg/ml bázičkých liečiv a HDI štandardu bázičkých liečiv o koncentrácii 1 µg/ml v deionizovanej vode. Ľudská krv vo forme DBS poskytovala najvyššie plochy píkov (97,4; 35,8; 28,3) oproti HDI štandardu (3,7; 2,9; 3,2), čo mohlo byť zapríčinené prostredím metanolu, ktorý znižoval vodivosť donorového roztoku.

4.4.2 Vplyv zloženia reálnej matrice na µEME

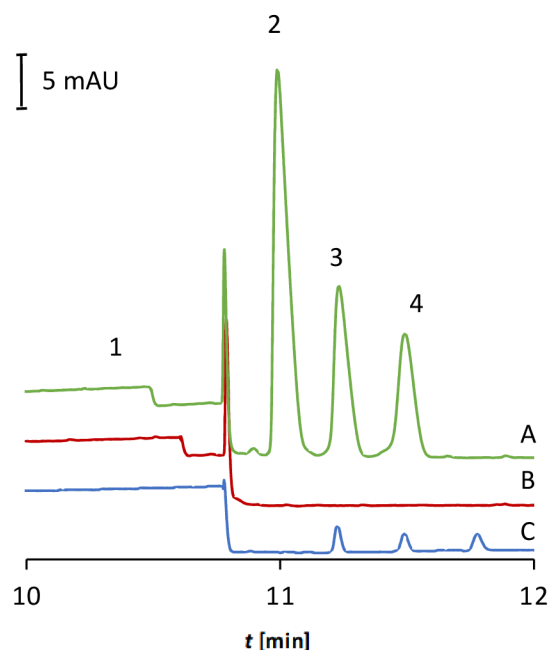
Krvná bodka bola eluovaná v 100% metanole s následným prídavkom vody (finálne 50% obj. metanolu), čím sa odstránil nežiadúci vplyv veľkého množstva matričných zložiek. Koncentrácia bázičkých liečiv vo výslednom donorovom roztoku bola 1 µg/ml (pôvodná koncentrácia bázičkých analytov v DBS bola 10 µg/ml) a táto matrica bola okyslená HAc. Koncentrácie HAc v donorovom roztoku boli testované 1 mM, 10 mM, 100 mM a 300 mM a k tomu bola odskúšaná neokyslená matrica. Bol očakávaný podobný trend, aký bol pozorovaný pri optimalizácii donorového roztoku s obsahom moču (viď kapitola 4.3.1). Bolo predpokladané aj na základe predchádzajúceho merania s ľudským močom, že čím bude vodivosť donorového roztoku vyššia, tak prenosi bázičkých analytov budú nižšie. S klesajúcou vodivosťou je možné obecné očakávať vyššie prenosi, ale vodivosť vzorky by mala byť vyššia než je hodnota vodivosti neokyslenej matrice. Výsledky zobrazené na obr. 29 potvrdzujú tento predpoklad. Neokyslená vzorka poskytuje najnižšie prenosi (plochy píkovi 12,6; 2,7; 1,2) bázičkých liečiv v dôsledku väčšieho pH voči okysleným donorovým maticiam. Viac okyslené roztoky (300 a 100mM HAc), kde vodivosti vzoriek sú najvyššie spomedzi meraného rozsahu, poskytujú vyšší prenos bázičkých analytov (12,0; 5,7; 5,2 a 34,1; 17,0; 11,1) ako v prípade neokyslenej rozpustenej krvi. Donorový roztok okyslený na finálnu koncentráciu 1 mM HAc vykazoval vyššie prenosi bázičkých liečiv (plochy píkovi 31,5; 10,6; 8,5) z dôvodu zvýšenej ionizácie analytov vďaka znižovaniu pH. Najvyššie prenosi bázičkých liečiv (plochy píkovi 85,1; 29,6; 27,7) boli dosiahnuté pri okyslení donorového roztoku na finálnu koncentráciu 10 mM. Pri tejto koncentrácii je splnená podmienka minimálneho okyslenia potrebného pre ionizáciu bázičkých analytov a optimálnu vodivosť prostredia.



Obr. 29: Vplyv pH donorového roztoku s obsahom reálnej matrice (kapilárna krv) na μ EME. Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval kapilárnu krv, 1 μ g/ml bázičických liečiv a 0–300mM HAc, 50% metanol; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptor (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

4.4.3 Zhrnutie optimálnych podmienok pre suché krvné bodky

Suchá krvná bodka bola eluovaná v metanole a následne vodou a okyslená vodným roztokom HAc na výslednú koncentráciu 10 mM. Obsah bázičických liečiv v takto pripravenom donorovom roztoku bol 1 μ g/ml. Ostatné extrakčné podmienky boli prevzaté z optimalizovaných podmienok pre ľudský moč a ich aplikovateľnosť bola overená na tejto matrici. Objem donoru pre extrakcie bol 10 μ l. FLM (2 μ l) bol oktanol. Akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda. EKS prebiehalo najefektívnejšie po dobu 2 minút pri extrakčnom napätí 10 kV. Tieto podmienky μ EME zaistili najvyšší prenos bázičických liečiv cez FLM. Porovnanie HDI štandardu, EKS okysleného blanku krvi bez bázičických liečiv a EKS krvi s bázičickými liečivami sú zobrazené na obr. 30. Oproti HDI štandardu bolo dosiahnuté zakoncentrovanie v rozmedzí 13–33 krát. Optimalizované podmienky zaručujú rýchly (do 2 minút) extrakčný proces spolu s priamym dávkovaním do kapiláry pre následnú analýzu. Táto metóda ponúka vysokú úsporu času (2–15 krát) aj na tejto matrici.



Obr. 30 Elektroforeogram DBS (EKS) a štandardu (HDI). Podmienky: EKS dávkaný donor (10 μ l) obsahoval DBS s/bez 1 μ g/ml bázických liečiv a 10mM HAc; FLM (2 μ l) bol oktanol; akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV. Podmienky pre štandard: zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); 1 μ g/ml bázických liečiv v deionizovanej vode (10 s, výškový rozdiel 30 cm). A - DBS s 1 μ g/ml bázických liečiv a 10mM HAc, B - blank DBS a 10mM HAc, C - štandard bázických liečiv 1 μ g/ml v deionizovanej vode. 1 - NH_4Ac , 2 - nortriptylin, 3 - haloperidol, 4 - loperamid.

4.4.4 Pracovný rozsah a linearita metódy

Donorový roztok po elúcii krvnej bodky obsahoval bázické liečivá o koncentrácií 0,05–2 μ g/ml a 10mM HAc v prostredí 50% metanolu. FLM bol oktanol a akceptorom bola deionizovaná voda. Boli vypočítané LOD a LOQ (viď v kapitole 2.8.1). RSD pre plochy píkov bázických liečiv bola vypočítaná z piatich meraní o koncentrácií bázických liečiv 1 μ g/ml. Hodnoty RSD nepresahujú 9%. Vypočítané hodnoty LOD, LOQ, RSD a koeficient spoľahlivosti sú zobrazené v tab. 5.

Tab. 5: Vypočítané validačné parametre μ EME-CE. Podmienky: donor (10 μ l) obsahoval DBS, bázické liečivá o koncentrácií (0,05–2 μ g/ml) a 10mM HAc. FLM (2 μ l) bol oktanol a akceptorom (2 μ l) bola deionizovaná voda; EKS (2 min, 10 kV); zóna NH_4Ac bola 300 mM, HDI (40 s); separačné napätie +20 kV.

	Nortriptylin	Haloperidol	Loperamid
LOD [μ g/ml]	0,004	0,015	0,019
LOQ [μ g/ml]	0,013	0,049	0,062
RSD [μ g/ml]	2,8	8,7	7,5
R^2	0,9970	0,9938	0,9962

4.5 Porovnanie navrhnutej inštrumentácie s ostatnými μ EME

Táto kapitola zhrňuje prednosti a dosiahnuté výhody tejto práce oproti predchádzajúcim publikovaným prácam, ktoré sa zaoberali μ EME v spojení s CE a boli zamerané na dosiahnutie zakoncentrovania analytov, alebo na automatizáciu celého procesu.

Jedna z nedávnych prác posúva vývoj v oblasti zakoncentrovania analytov priamo do organickej fázy, ktorá je následne analyzovaná [4]. Táto práca využíva minimálne množstvo FLM, voľne umiestnenej na väčšom objeme roztoku donoru a do obidvoch fáz sú vložené elektródy pre prenos. Značnou nevýhodou tejto práce bolo, že kvapka organického solventu bola nestabilná, musela byť pre analýzu následne odobraná ručne pipetou a dopravená do systému CE manuálne. Nekompatibilita niektorých organických solventov navyše spôsobovala problémy pri separačnom kroku a museli byť riedené metanolom (čím sa opäť znížila citlivosť metódy) a kapilára musela byť dôkladne premývaná organickým solventom. Tieto kroky boli vyvážené dosiahnutím nižších detekčných limitov (LOD: nortriptylin 5 ng/ml, haloperidol 8 ng/ml a loperamid 5 ng/ml). Výhoda systému navrhnutého v tejto diplomovej práci je, že odbúrala oproti zmieňovanej práci niekoľko krokov: manuálne prenášanie organickej fázy a jeho riedenie pre možnosť analýzy, manipuláciu s kvapkou organického solventu (FLM) na povrchu roztoku donoru pre možnosť analýzy a obnovenie povrchu kapiláry organickým solventom a výrazne znížila objem vzorky.

Druhá práca pracovala v obdobnom usporiadaní a bola taktiež prepojená s CE, avšak v off-line režime [5]. Táto práca bola zameraná na automatizáciu a manipuláciu s roztokmi pre prevedenie extrakčného kroku a kompletne prenosi analytov z donorovej fázy do akceptorovej s cieľom dosiahnutia čo najvyššej extrakčnej účinnosti. Avšak táto práca poskytovala len poloautomatické prevedenie μ EME a opäť bol nutný manuálny prenos akceptorovej fázy do CE systému. Oproti predchádzajúcej práci tu dochádzalo k takmer kompletnému prenosu vybraných liečiv (LOD pre nortriptylin 0,1 μ g/ml, haloperidol 0,1 μ g/ml a loperamid 0,15 μ g/ml), do CE systému sa prenášala len čistá vodná fáza s bázickými analytmi, ale v rámci tejto separácie neprebiehalo žiadne ďalšie zakoncentrovanie.

Prezentovanému usporiadaniu sa najviac približovala práca využívajúca komerčnú CE zostavu, kde všetky kroky boli automatizované [1]. Táto práca uskutočňovala operácie so všetkými roztokmi pre μ EME aj následný CE separačný krok automaticky v rámci nastavenej sekvencie. Bolo dosiahnutých pomerne nízkych detekčných limitov (LOD pre paraquat 4 ng/ml a díquat 5 ng/ml). Avšak táto práca poukazovala iba na využitie princípu a zlepšenie oproti ostatným prácam využívajúce len EKS a tITP, prípadne ďalšie zaostrovacie a prekoncentračné techniky popisované v úvodných častiach tejto diplomovej práci, ale publikovaná práca sa nezaoberala analýzami zložitejších matric, ani ich nijakým spôsobom nekomentovala. K analýzám slúžili len vzorky riečnej vody s obsahom herbicídu. Ďalšou nevýhodou tejto publikovanej techniky bola nutnosť precíznej manipulácie s kapilárou a malými objemami roztokov, čo predovšetkým u viskóznejších organických solventov môže

byť problém. Ďalej to bola samotná nutnosť manipulácie a interakcie kvapky organickej membrány s povrchom kapiláry, čo môže pri nutnosti voľby odlišných kvapalných membrán (ENB, NPOE) činiť značné problémy pri CE analýze, takže táto technika je výrazne limitovaná použitím organického solventu, ktorý neinteraguje s vnútorným povrchom kapiláry. Ako ďalšia veľká nevýhoda je, že pre elektrokinetické nadávkovanie vzorku sa musela kapilára a aj elektródy ponoriť do roztoku donoru, takže pri použití komplexnejšej matrice, by došlo k nachytaniu matričných komponent na elektródy a vonkajší povrch kapiláry, čo by ovplyvňovalo následné analýzy. Aj napriek použitiu komerčnej inštrumentácie a automatizovateľnosti celého procesu má táto technika radu nevýhod a limitov, ktoré obmedzujú toto usporiadanie na celkom úzky rozsah použitia len kompatibilných organických membrán a zložením matrice jednoduchých vzoriek. Usporiadanie prezentované v tejto diplomovej práci má oproti tejto technike výhodu, že organická membrána ani akákoľvek vzorka so zložitou maticou nepríde do kontaktu s kapilárou a analyty sú dávkované taktiež priamo do kapiláry, kde sú následné zaostrené a zakoncentrované behom CE analýzy. Ďalšie publikované práce síce využívajú princípy EKS, online zakoncentrovanie behom separačného kroku, alebo behom dávkovania vzorky, ale je tu vynechaná fáza prečistenia analytov cez selektívnu organickú membránu tak, že kapilára s elektródou je ponorená do roztoku vzorku a použiteľnosť na telové tekutiny sa tak znižuje.

Inštrumentálne prevedenie systému popisované v tejto diplomovej práci zjednodušuje prácu so vzorkami o niekoľko krokov. Prvým zjednodušením bolo použitie jednej inštrumentácie pre obidva kroky (μ EME a CE). Za druhé bolo zabezpečené dávkovanie sledovaných analytov z donorového roztoku priamo do kremennej kapiláry CE, ktorá sa nachádza v čistej časti (v akceptorovom roztoku), takže nie je možné aby sa časť matrice a analytov uchytila na týchto komponentoch a skresľovala tak analýzy. Ďalej je to odbúravanie krokov, kedy akceptorový roztok musel byť manuálne prenášaný, eventuálne upravený pre následné CE stanovenie a dávkovanie analytov prebiehalo už súbežne s extrakciou. Navyše táto práca zabezpečuje ďalšie zaostrenie a zakoncentrovanie analytov, či už v rámci prenosu z donorového roztoku, alebo behom separácie vďaka použitiu zaostrovacieho elektrolytu.

Napriek všetkým spomenutým výhodám táto metóda v tomto inštrumentálnom usporiadaní zatiaľ neumožňuje automatizáciu celého procesu. Umiestnenie kapiláry do akceptorového roztoku vyžaduje manuálnu a precíznu prácu vždy, tak aby bola kapilára umiestnená v rovnakej polohe od FLM. Pre niektoré bázičné liečivá LOD tejto metódy nemusí dostačovať pre spoľahlivú detekciu sledovaných analytov na úrovni ich terapeutických hladín. Všetky tieto nedostatky sú v súčasnej dobe predmetom ďalšieho výskumu, ktorý povedie k ďalšiemu zlepšeniu navrhovaného analytického postupu.

5 Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bol vývoj in-line inštrumentácie prepojujúcej μ EME s CE spolu s prekoncentračnými technikami EKS a tITP a experimentálne otestovanie navrhnutého inštrumentálneho prepojenia pre priamu analýzu reálnych komplexných biologických vzoriek. Pre možnosť plnej kontroly a presnej manipulácie s jednotlivými komponentami (kapilára, elektródy) systému bola zvolená práca na laboratórnej CE sústave, kde bolo možné pozorovať prebiehajúce procesy v μ EME v reálnom čase. Vyvinutý systém poskytuje prečistenie modelových analytov v komplexných biologických vzorkách, zakoncentrovanie analytov v separačnej kapiláre a následne ich analýzu. Oproti predchádzajúcim publikovaným systémom využívajúce μ EME v rámci komerčnej CE zostavy bol v tejto práci zamedzený kontakt kapiláry s prostredím vzorky a vylučuje manipuláciu s organickou fázou vo vnútri kapiláry. Ďalej táto metóda ponúka vysokú úsporu času počas μ EME, kde čas extrakcie spolu s dávkovaním bol výrazne znížený (2 min) oproti klasickým off-line EME a μ EME systémom (5–30 min).

V rámci tejto práce boli optimalizované extrakčné a separačné podmienky, prevedené na reálnej matici (ľudský moč) s prídavkom modelových analytov. Optimalizácia zahrňovala v prvej rade odladenie samotného separačného kroku a zaostrenie analytov v rámci tITP. Nasledovala optimalizácia extrakčných podmienok, predovšetkým zloženie a objemy jednotlivých fáz, doby a veľkosti vloženého napätia. Na záver boli vybrané podmienky aplikované na ďalšiu reálnu maticu – eluované suché krvné bodky s pridanými liečivami, ktoré potvrdili robustnosť optimálnych podmienok z hľadiska možnosti použitia rôznych matic.

Perspektívou do budúcnosti vzhľadom k dosiahnutým nižším limitom detekcie predstavenej techniky, ktoré boli zrovnateľné, alebo vyššie ako terapeutické hodnoty modelových liečiv, by mohla byť aplikácia citlivejšieho detekčného systému (hmotnostná sepektrometrická detekcia), alebo ďalšie úpravy, extrakčných a separačných podmienok (napríklad zmena základného elektrolytu, doplnenie terminačného elektrolytu s optimalizovanou elektroforetickou mobilitou a iné), čo je predmetom ďalšieho skúmania.

Predložená diplomová práca otvorila nové možnosti pre využitie in-line μ EME-CE usporiadania pre analýzu komplexných vzoriek biologického pôvodu s komplexnejším zložením. Bola tak načrtnutá cesta k zjednodušeniu a možnej automatizácii tejto metódy a aplikácií na rôznu škálu telových tekutín. Atraktivnosť tejto metódy môže naviac zvýšiť následný vývoj, ktorý zaistí dosiahnutie potrebných detekčných limitov analytov v rozsahu terapeutických koncentrácií ($\mu\text{g/ml}$) vybraných analytov.

6 Použitá literatura

- [1] CHUI, Mei Qi, Lee Yien THANG a Hong Heng SEE. Integration of the free liquid membrane into electrokinetic supercharging – capillary electrophoresis for the determination of cationic herbicides in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. 2017, 1481 (1), 145–151. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.12.042.
- [2] POOLE, Colin F. *Solid phase extraction*. Amsterdam: Elsevier, 2020. ISBN 978-0-12-816906-3.
- [3] POOLE, Colin F. *Liquid-Phase Extraction*. Amsterdam: Elsevier, 2020, 816 s. ISBN 978-0-12-816911-7.
- [4] ŠLAMPOVÁ, Andrea a Pavel KUBÁŇ. Two-phase micro-electromembrane extraction with a floating drop free liquid membrane for the determination of basic drugs in complex samples. *Talanta*. 2020, 206 (1), 2–8. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120255.
- [5] DVOŘÁK, Miloš, Knut Fredrik SEIP, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Pavel KUBÁŇ. Semi-automated set-up for exhaustive micro-electromembrane extractions of basic drugs from biological fluids. *Analytica Chimica Acta*. 2018, 1005 (1), 34–42. DOI: 10.1016/j.aca.2017.11.081.
- [6] CHEN, Yonglei, Wenjuan LÜ, Xingguo CHEN a Min TENG. Review of recent developments of on-line sample stacking techniques and their application in capillary electrophoresis. *Open Chemistry*. 2012, 10 (3), 611–638. DOI: 10.2478/s11532-012-0007-4.
- [7] TIMERBAEV, Andrei R. a Takeshi HIROKAWA. Recent advances of transient isotachopheresis-capillary electrophoresis in the analysis of small ions from high-conductivity matrices. *Electrophoresis*. 2006, 27 (1), 323–340. DOI: 10.1002/elps.200500320.
- [8] JEANNOT, Michael A. a Frederick F. CANTWELL. Solvent Microextraction into a Single Drop. *Analytical Chemistry*. 1996, 68 (13), 2236–2240. DOI: 10.1021/ac960042z.
- [9] PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a Knut Einar RASMUSSEN. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1999, 71 (14), 2650–2656. DOI: 10.1021/ac990055n.
- [10] REZAEI, Mohammad, Yaghoub ASSADI, Mohammad-Reza MILANI HOSSEINI, Elham AGHAEI, Fardin AHMADI a Sana BERIJANI. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1116 (1–2), 1–9. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.03.007.

- [11] AVALCÁRCEL, Miguel, Soledad CÁRDENAS a Rafael LUCENA, ed. *Analytical Microextraction Techniques*. Sharjah, UAE: Bentham Science Publishers, 2017. ISBN: 978-1-68108-308-3.
- [12] ARTHUR, Catherine L. a Janusz. PAWLISZYN. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 1990, 62 (19), 2145–2148. DOI: 10.1021/ac00218a019.
- [13] KATAOKA, Hiroyuki. Recent developments and applications of microextraction techniques in drug analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, 396 (1), 339–364. DOI: 10.1007/s00216-009-3076-2.
- [14] BUCHHOLZ, Karen D. a Janusz. PAWLISZYN. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. *Analytical Chemistry*. 2002, 66 (1), 160–167. DOI: 10.1021/ac00073a027.
- [15] BALTUSSEN, Erik, Pat SANDRA, Frank DAVID a Carel CRAMERS. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*. 1999, 11 (10), 737–747. DOI: 10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4.
- [16] JIANG, Ruifen a Janusz PAWLISZYN. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2012, 39 (1), 245–253. DOI: 10.1016/j.trac.2012.07.005.
- [17] PAUWELS, An, David A. WELLS, Adrian COVACI a Paul J.C. SCHEPENS. Improved sample preparation method for selected persistent organochlorine pollutants in human serum using solid-phase disk extraction with gas chromatographic analysis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 1999, 723 (1-2), 117-125. DOI: 10.1016/S0378-4347(98)00493-9.
- [18] ABDEL-REHIM, Mohamed. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications. *Journal of Chromatography B*. 2004, 801 (2), 317–321. DOI: 10.1016/j.jchromb.2003.11.042.
- [19] SAITO, Yoshihiro, Ikuo UETA, Mitsuhiro OGAWA, Akira ABE, Kentaro YOGO, Shingoro SHIRAI a Kiyokatsu JINNO. Fiber-packed needle-type sample preparation device designed for gas chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, 393 (3), 861–869. DOI: 10.1007/s00216-008-2400-6.
- [20] AUDUNSSON, Gudjon. Aqueous/aqueous extraction by means of a liquid membrane for sample cleanup and preconcentration of amines in a flow system. *Analytical Chemistry*. 2002, 58 (13), 2714–2723. DOI: 10.1021/ac00126a030.
- [21] PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a Knut Einar RASMUSSEN. Liquid–Liquid–Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids

- Prior to Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*. 1999, 71 (14), 2650–2656. DOI: 10.1021/ac990055n.
- [22] PEDERSEN-BJERGAARD, Stig a Knut Einar RASMUSSEN. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. *Journal of Chromatography A*. 2006, 1109 (2), 183–190. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.01.025
- [23] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Micro-electromembrane extraction across free liquid membranes. Instrumentation and basic principles. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1346 (1), 25–33. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.04.047.
- [24] KOHLER, Isabelle, Julie SCHAPPLER a Serge RUDAZ. Microextraction techniques combined with capillary electrophoresis in bioanalysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, 405 (1), 125–141. DOI: 10.1007/s00216-012-6367-y.
- [25] ABDOLLAHZADEH, Yaser, Yadollah YAMINI, Ali JABBARI, Ali ESRAFILI a Mohammad REZAEI. Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography for determination of organophosphorus pesticides in water and soil samples. *Analytical Methods*. 2012, 4 (3), 830–837. DOI: 10.1039/c2ay05653d.
- [26] CHOI, Kihwan, Jungyeon KIM, Yong Oh JANG a Doo Soo CHUNG. Direct chiral analysis of primary amine drugs in human urine by single drop microextraction in-line coupled to CE. *Electrophoresis*. 2009, 30 (16), 2905–2911. DOI: 10.1002/elps.200800829.
- [27] CHOI, Jeongmi, Kihwan CHOI, Jihye KIM, Ahmed Yacine Badjah Hadj AHMED, Zeid A. AL-OTHMAN a Doo Soo CHUNG. Sensitive analysis of amino acids with carrier-mediated single drop microextraction in-line coupled with capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218 (41), 7227–7233. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.08.035.
- [28] YANGCHENG, Lu, Lin QUAN, Luo GUANGSHENG a Dai YOUYUAN. Directly suspended droplet microextraction. *Analytica Chimica Acta*. 2006, 566 (2), 259–264. DOI: 10.1016/j.aca.2006.02.072.
- [29] FANG, Huaifang, Zhaorui ZENG a Lan LIU. Centrifuge Microextraction Coupled with On-Line Back-Extraction Field-Amplified Sample Injection Method for the Determination of Trace Ephedrine Derivatives in the Urine and Serum. *Analytical Chemistry*. 2006, 78 (17), 6043–6049. DOI: 10.1021/ac060360q.
- [30] FANG, Huaifang, Zhaorui ZENG, Lan LIU a Daiwen PANG. On-Line Back-Extraction Field-Amplified Sample Injection Method for Directly Analyzing Cocaine and Thebaine in the Extractants by Solvent Microextraction. *Analytical Chemistry*. 2006, 78 (4), 1257–1263. DOI: 10.1021/ac0516537.

- [31] TANKEVICIUTE, Aukse, Rolandas KAZLAUSKAS a Vida VICKACKAITE. Headspace extraction of alcohols into a single drop. *The Analyst*. 2001, 126 (10), 1674-1677. DOI: 10.1039/b103493f.
- [32] SIKANEN, Tiina, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Henrik JENSEN, Risto KOSTIAINEN, Knut Einar RASMUSSEN a Tapio KOTIAHO. Implementation of droplet-membrane-droplet liquid-phase microextraction under stagnant conditions for lab-on-a-chip applications. *Analytica Chimica Acta*. 2010, 658 (2), 133–140. DOI:10.1016/j.aca.2009.11.002.
- [33] LI, Pingjing, Xing ZHANG a Bin HU. Phase transfer membrane supported liquid-liquid-liquid microextraction combined with large volume sample injection capillary electrophoresis–ultraviolet detection for the speciation of inorganic and organic mercury. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218 (52), 9414–9421. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.10.071.
- [34] HO, Tung Si, Trine Grønhaug HALVORSEN, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Knut Einar RASMUSSEN. Liquid-phase microextraction of hydrophilic drugs by carrier-mediated transport. *Journal of Chromatography A*. 2003, 998 (1–2), 61–72. DOI: 10.1016/S0021-9673(03)00634-4.
- [35] JIANG, Xianmin, Chanbasha BASHEER, Jie ZHANG a Hian Kee LEE. Dynamic hollow fiber-supported headspace liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2005, 1087 (1–2), 289–294. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.06.010.
- [36] JONSSON, Jan Ake a Lennart MATHIASSEN. Membrane-based techniques for sample enrichment. *Journal of Chromatography A*. 2000, 902 (1), 205–225. DOI: 10.1016/S0021-9673(00)00922-5.
- [37] HUANG, Chuixiu, Xiantao SHEN, Astrid GJELSTAD a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Investigation of alternative supported liquid membranes in electromembrane extraction of basic drugs from human plasma. *Journal of Membrane Science*. 2018, 548 (1), 176–183. DOI: 10.1016/j.memsci.2017.11.001.
- [38] PETERSEN, Nickolaj Jacob, Henrik JENSEN, Steen Honoré HANSEN, Sunniva Taule FOSS, Detlef SNAKENBORG a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. On-chip electro membrane extraction. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2010, 9 (4–5), 881–888. DOI: 10.1007/s10404-010-0603-6.
- [39] BASHEER, Chanbasha, Jingyi LEE, Stig PEDERSEN-BJERGAARD, Knut Einar RASMUSSEN a Hian Kee LEE. Simultaneous extraction of acidic and basic drugs at neutral sample pH: A novel electro-mediated microextraction approach. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217 (43), 6661–6667. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.04.066.

- [40] PAYÁN, María D. Ramos, Bin LI, Nickolaj Jacob PETERSEN, Henrik JENSEN, Steen Honoré HANSEN a Stig PEDERSEN-BJERGAARD. Nano-electromembrane extraction. *Analytica Chimica Acta*. 2013, 785 (1), 60–66. DOI: 10.1016/j.aca.2013.04.055.
- [41] DAVARANI, Saied Saeed Hosseiny, Amin MORTEZA-NAJARIAN, Saeed NOJAVAN, Ahmad POURAHADI a Mojtaba Beigzadeh ABBASSI. Two-phase electromembrane extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Separation Science*. 2013, 36 (4), 736–743. DOI: 10.1002/jssc.201200838.
- [42] EIBAK, Lars Erik Eng, Marthe Petrine PARMER, Knut Einar RASMUSSEN, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid GJELSTAD. Parallel electromembrane extraction in a multiwell plate. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, 406 (2), 431–440. DOI: 10.1007/s00216-013-7345-8.
- [43] KUBÁŇ, Pavel a Petr BOČEK. Micro-electromembrane extraction across free liquid membranes. Extractions of basic drugs from undiluted biological samples. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1337 (1), 32–39. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.02.046.
- [44] CARRASCO-CORREA, Javier Enrique, Pavel KUBÁŇ, David J. COCOVI-SOLBERG a Manuel MIRÓ. Fully Automated Electric-Field-Driven Liquid Phase Microextraction System with Renewable Organic Membrane As a Front End to High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*. 2019, 91 (16), 10808–10815. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b02453.
- [45] LI, S. F. Y. *Capillary electrophoresis: principles, practice, and applications*. New York: Elsevier, 1992. ISBN 04-448-9433-0.
- [46] LANDERS, James P. *Handbook of capillary electrophoresis*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, c1997. ISBN 08-493-2498-X.
- [47] ZOSKI, Cynthia G. *Handbook of electrochemistry*. Boston: Elsevier, c2007. ISBN 978-044-4519-580.
- [48] CAMILLERI, Patrick. *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 2nd ed. Boca Raton, Fla.: CRC Press, c1998. ISBN 978-084-9391-279.
- [49] FORET, František, Ludmila KŘIVÁNKOVÁ a Petr BOČEK. *Capillary zone electrophoresis*. New York: VCH, c1993. ISBN 1-56081-765-8.
- [50] LI, S. F. Y. *Capillary electrophoresis: principles, practice and applications*. Amsterdam: Elsevier, 1992. ISBN 04-448-9433-0.
- [51] CHANKVETADZE, Bezhan. *Capillary electrophoresis in chiral analysis*. New York: John Wiley, c1997. ISBN 978-0-471-97415-4.

- [52] BREADMORE, Michael C. Electrokinetic and hydrodynamic injection: making the right choice for capillary electrophoresis. *Bioanalysis*. 2009, 1 (5), 889–894. DOI: 10.4155/bio.09.73.
- [53] GEBAUER, Petr, Wolfgang THORMANN a Petr BOČEK. Sample self-stacking and sample stacking in zone electrophoresis with major sample components of like charge: General model and scheme of possible modes. *Electrophoresis*. 1995, 16 (1), 2039–2050. DOI: 10.1002/elps.11501601333.
- [54] ALMEDA, Sara, Lourdes ARCE a Miguel VALCARCEL. The More and Less Common Approaches to Enhancing Sensitivity in Capillary Electrophoresis. *Current Analytical Chemistry*. 2010, 6 (2), 126–143. DOI: 10.2174/157341110790945508.
- [55] HIROKAWA, Takeshi, Hikaru OKAMOTO a Bohuslav GAŠ. High-sensitive capillary zone electrophoresis analysis by electrokinetic injection with transient isotachophoretic preconcentration: Electrokinetic supercharging. *ELECTROPHORESIS*. 2003, 24 (3), 498–504. DOI: 10.1002/elps.200390058.
- [56] BUSNEL, Jean-Marc, Niels LION a Hubert H. GIRAULT. Electrokinetic supercharging for highly efficient peptide preconcentration in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 2008, 29 (7), 1565–1572. DOI: 10.1002/elps.200700643.
- [57] DROUIN Nicolas, Pavel KUBÁŇ, Serge RUDAZ, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Julie SCHAPPLER. Electromembrane extraction: Overview of the last decade. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2019, 113 (1), 357–363. DOI: 10.1016/j.trac.2018.10.024.
- [58] PANTŮČKOVÁ, Pavla, Pavel KUBÁŇ a Petr BOČEK. Sensitivity enhancement in direct coupling of supported liquid membrane extractions to capillary electrophoresis by means of transient isotachophoresis and large electrokinetic injections. *Journal of Chromatography A*. 2015, 1389 (1), 1–7. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.02.026.
- [59] LU, Y., X. HOU, D. WANG a H. ZHONG. Advances of a capillary electrophoretic on-line concentration technique: Electrokinetic supercharging. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017, 40 (10), 528–535. DOI: 10.1080/10826076.2017.1330756.
- [60] WANG, Wei-feng, Fu-rong JU, Yan-li RAN, ZHANG a Xing-guo CHEN. Detection of biogenic amines in C57BL/6 mice brain by capillary electrophoresis electrokinetic supercharging. *The Analyst*. 2016, 141 (3), 956–962. DOI: 10.1039/C5AN01642H.
- [61] THANG, Lee Yien, Michael C. BREADMORE a Hong Heng SEE. Electrokinetic supercharging in nonaqueous capillary electrophoresis for online preconcentration

- and determination of tamoxifen and its metabolites in human plasma. *Journal of Chromatography A*. 2016, 1461 (1), 185–191. DOI: 10.1016/j.chroma.2016.07.067.
- [62] LU, Yuanqi, Dunqing WANG, Chunyan KONG, Chunjing JIA a Michael C. BREADMORE. Analysis of Melamine in Milk Powder and Liquid Milk by Capillary Zone Electrophoresis After Electrokinetic Supercharging. *Food Analytical Methods*. 2015, 8 (5), 1356–1362. DOI: 10.1007/s12161-014-9987-3.
- [63] ABDUL KARIM, Nurul 'I., Wan A. WAN IBRAHIM, Mohd M. SANAGI a Aemi S. ABDUL KEYON. Online preconcentration by electrokinetic supercharging for separation of endocrine disrupting chemical and phenolic pollutants in water samples. *Electrophoresis*. 2016, 37 (20), 2649–2656. DOI: 10.1002/elps.201600207.
- [64] DAWOD, Mohamed, Michael C. BREADMORE, Rosanne M. GUIJT a Paul R. HADDAD. Counter-flow electrokinetic supercharging for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples. *Journal of Chromatography A*. 2009, 1216 (15), 3380–3386. DOI: 10.1016/j.chroma.2009.02.014.
- [65] HIROKAWA, Takeshi, Masato YOSHIOKA, Hikaru OKAMOTO, Andrei R. TIMERBAEV a Gottfried BLASCHKE. High-sensitivity capillary electrophoresis determination of inorganic anions in serum and urine using on-line preconcentration by transient isotachopheresis. *Journal of Chromatography B*. 2004, 811 (2), 165–170. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.08.035.
- [66] ZHENG, Lihui, Lan ZHANG, Ping TONG, Xinyu ZHENG, Yuwu CHI a Guonan CHEN. Highly sensitive transient isotachopheresis sample stacking coupling with capillary electrophoresis-amperometric detection for analysis of doping substances. *Talanta*. 2010, 81 (4–5), 1288–1294. DOI: 10.1016/j.talanta.2010.02.023.
- [67] AHMED, Omar S., Yoann LADNER, Jérôme MONTELS, Laurent PHILIBERT a Catherine PERRIN. Coupling of salting-out assisted liquid–liquid extraction with on-line stacking for the analysis of tyrosine kinase inhibitors in human plasma by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*. 2018, 1579 (1), 121–128. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.10.017.
- [68] KONG, Yu, Ning ZHENG, Zhichao ZHANG a Ruyu GAO. Optimization stacking by transient pseudo-isotachopheresis for capillary electrophoresis: example analysis of plasma glutathione. *Journal of Chromatography B*. 2003, 795 (1), 9–15. DOI: 10.1016/S1570-0232(03)00475-6
- [69] MATOUŠ, Bohuslav. *Základy lékařské chemie a biochemie*. Praha: Galén, c2010. ISBN 978-80-7262-702-8.
- [70] EIBAK, Lars Erik Eng, Anne Bee HEGGE, Knut Einar RASMUSSEN, Stig PEDERSEN-BJERGAARD a Astrid. Alginate and Chitosan Foam Combined

- with Electromembrane Extraction for Dried Blood Spot Analysis. *Analytical Chemistry*. 2012, 84 (20), 8783–8789. DOI: 10.1021/ac301996n.
- [71] WILHELM, Abraham J., Jeroen C. G. DEN BURGER a Eleonora L. SWART. Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clinical Pharmacokinetics*. 2014, 53 (11), 961–973. DOI: 10.1007/s40262-014-0177-7.
- [72] TRIFONOVA, MASLOV, BALASHOVA a LOKHOV. Evaluation of Dried Blood Spot Sampling for Clinical Metabolomics: Effects of Different Papers and Sample Storage Stability. *Metabolites*. 2019, 9 (11), 1–13. DOI: 10.3390/metabo9110277.
- [73] DUCHOWICZ, Pablo R., Alan TALEVI, Carolina BELLERA, Luis E. BRUNO-BLANCH a Eduardo A. CASTRO. Application of descriptors based on Lipinski's rules in the QSPR study of aqueous solubilities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007, 15 (11), 3711–3719. DOI: 10.1016/j.bmc.2007.03.044.
- [74] LEO, Albert, Corwin HANSCH a David ELKINS. Partition coefficients and their uses. *Chemical Reviews*. 1971, 71 (6), 525–616. DOI: 10.1021/cr60274a001.
- [75] PANTŮČKOVÁ, Pavla a Pavel KUBÁŇ. In-line coupling of supported liquid membrane extraction to capillary electrophoresis for simultaneous analysis of basic and acidic drugs in urine. *Journal of Chromatography A*. 2017, 1519 (1), 137–144. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.08.084.
- [76] SCHULZ, Martin, Stefanie IWERSEN-BERGMANN, Hilke ANDRESEN a Achim SCHMOLDT. Therapeutic and toxic blood concentrations of nearly 1,000 drugs and other xenobiotics. *Critical Care*. 2012, 16 (4), 1–4. DOI: 10.1186/cc11441.
- [77] ŠEVČÍK, Jiří Georg Kamil. *Metodologie měření v analytické chemii*. Praha, 1996. ISBN 80-718-4271-0
- [78] LUČAJ, Martin. *Využití mikroextrakčních technik v analýze biologických vzorků*. Brno, 2019. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Miloš Dvořák.
- [79] DEWICK, Paul M. *Essentials of organic chemistry: for students of pharmacy, medicinal chemistry and biological chemistry*. Chichester: J. Wiley, c2006. ISBN 978-0-470-01666-4.
- [80] DVOŘÁK, Miloš, Lenka RYŠAVÁ a Pavel KUBÁŇ. Capillary Electrophoresis with Capacitively Coupled Contactless Conductivity Detection for Quantitative Analysis of Dried Blood Spots with Unknown Blood Volume. *Analytical Chemistry*. 2019, 92 (1), 1557–1564. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04845.

7 Zoznam použitých skratiek a symbolov

BGE	základný elektrolyt
CE	kapilárna elektroforéza
CME	centrifuge microextraction
CM-LPME	carrier-mediated liquid-phase microextraction
CM-SDME	carrier-mediated single-drop microextraction
CZE	kapilárna zónová elektroforéza
DBS	suchá krvná bodka
DLLME	dispersive liquid-liquid microextraction
DMD-LPME	droplet-membrane-droplet liquid-phase microextraction
DSDME	directly suspended droplet microextraction
EME	elektromembránová extrakcia
μ EME	mikro-elektromembránová extrakcia
EKS	elektrokinetický supercharging
ENB	1-ethyl-2-nitrobenzén
FLM	voľná kvapalná membrána
FNME	Fiber-packed needle microextraction
FSPME	fiber solid-phase microextraction
HF-LPME	hollow fiber liquid-phase microextraction
HS-SDME	headspace single-drop microextraction
HF-HS-LPME	hollow fiber and headspace liquid-phase microextraction
ILBE	in-line back-extraction
LE	vedúci elektrolyt
LPME	liquid-phase microextraction
MEPS	microextraction by packed sorbent
NPOE	2-nitrofenyloctyléter
OLBE	on-line back-extraction
PFA	perfluóralkoxyonát
PP	polypropylén
PTFE	polytetraflúoroetylén
PT-LLLME	phase transfer based liquid-liquid-liquid microextraction
SBSE	stir-bar-sorptive extraction
SDME	single drop microextraction
SLM	kvapalná membrána na pevnom nosiči
SPDE	solid phase disk extraction
SPME	solid-phase microextraction
TE	terminačný elektrolyt
TFME	thin film solid-phase microextraction

tITP

tranzientná izotachoforéza

USA-EME

ultrasound-assisted emulsification microextraction