

*Uniwersytet Jagielloński
w Krakowie*

Wydział Chemii



Agnieszka Moos

*Analiza alternatywnych materiałów biologicznych
na potrzeby ekspertyzy toksykologicznej*

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Promotorzy:

Prof. dr hab. Paweł Kościelniak

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Kłys

Kraków, 2015

Niniejsza rozprawa doktorska została wykonana w ramach projektu pod nazwą Interdyscyplinarne Studia Doktoranckie „Nauki molekularne dla medycyny” współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego – Program Operacyjny Kapitał Ludzki 2007-2013.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



1. WSTĘP

Toksykologia (gr. *toxicon* – trucizna, *logos* – nauka) jest nauką interdyscyplinarną, badającą związki przyczynowo – skutkowe, powodowane obecnością czynnika toksycznego i efektem biologicznym. O jej rozwoju decyduje postęp w diagnostyce i terapii, ale też w metodach analizy jakościowej i ilościowej.

Poszukiwanie związku między czynnikiem toksycznym, a wywołanym efektem, wymaga dobrania odpowiedniego materiału biologicznego i właściwego toku postępowania, czyli sposobów przygotowania próbek biologicznych do analizy i metod analitycznych.

Podstawowymi metodami szeroko stosowanymi w analizie toksykologicznej są metody chromatograficzne, przede wszystkim chromatografia cieczowa i gazowa, sprzężone z różnymi detektorami, z którymi największe znaczenie we współczesnej toksykologii ma spektrometr mas. Jego zastosowanie wpłynęło zarówno na poprawę selektywności i czułości stosowanych metod oraz na polepszenie wykrywalności substancji w próbkach biologicznych.

Znaczący rozwój obserwuje się także na etapie przygotowania próbki do analizy. Jest to niezwykle istotny etap wpływający w głównej mierze na wynik końcowy analizy. Jedną z rozwijających się technik ekstrakcyjnych jest mikroekstrakcja na upakowanym sorbencie (MEPS), zapewniająca oddzielenie analitu od matrycy w krótkim czasie, niewielkie zużycie rozpuszczalników oraz próbki, dzięki czemu MEPS jest przyjazna środowisku.

W ekspertyzie toksykologicznej najczęściej wykorzystuje się podstawowe materiały biologiczne takie jak krew i mocza. Mimo to obserwuje się wzrost zainteresowania materiałami alternatywnymi (np. płyn z jamy ustnej), gdyż ich analiza nadaje ekspertyzie charakter kompleksowy.

Potrzeba ciągłego doskonalenia metod przygotowywania próbek do analizy chemicznej jak i samych technik analizy instrumentalnej, zmotywowały autorkę rozprawy do podjęcia badań nad opracowywaniem nowych metod analitycznych służących identyfikacji i oznaczaniu substancji psychotropowych w alternatywnym i podstawowym materiale biologicznym.

Opisane badania prowadzono w latach 2011 – 2015 w Pracowni Chemii Sądowej na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego we współpracy z Pracownią Toksykologii Katedry i Zakładu Medycyny Sądowej Collegium Medicum UJ.

2. CEL BADAŃ

Celem pracy było opracowanie metod analizy próbek biologicznych ze szczególnym uwzględnieniem materiałów alternatywnych (płynu z jamy ustnej i płynu łzowego), a także materiału podstawowego (krwi) pod kątem wykrywania i oznaczania wybranych leków psychotropowych z grup: a) trójpierścieniowych leków przeciwdepresyjnych, b) benzodiazepin, c) leków psychotropowych nowej generacji (selektywnych inhibitorów wychwytu zwrotnego serotoniny oraz serotoniny i noradrenaliny), i d) leków nasennych nowej generacji (tzw. leków „Z”: zaleplon, zolpidem, zopiklon). Wybierając leki do badań kierowano się przede wszystkim ich dostępnością w Polsce i ich znaczeniem w leczeniu schorzeń psychicznych.

Analiza próbek płynu łzowego pod kątem wykrywania i identyfikacji substancji psychotropowych nie była dotąd przedmiotem intensywnych badań chemiczno-toksykologicznych w kontekście przydatności analitycznej alternatywnych materiałów biologicznych do wykrywania i oznaczania leków psychotropowych.

Do izolacji analitów zastosowano mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie (MEPS), która nie była wcześniej stosowana do izolacji leków psychotropowych z tych alternatywnych materiałów biologicznych, jakie były przedmiotem badań.

Do eksperymentów wybrano metodę chromatografii cieczowej, którą zastosowano w trzech wariantach: wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem UV (HPLC-UV), ultrawysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas (UHPLC-MS) oraz chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS-MS). Odmienną metodą analityczną zaaplikowaną do badań była elektroforeza kapilarna z detekcją spektrofotometryczną w zakresie ultrafioletu (CE-UV).

Uzupełnieniem badań zrealizowanych w ramach niniejszej pracy była analiza próbek płynu z jamy ustnej i krwi, pobranych od pacjentów Pododdziału Chorób Afektywnych Oddziału Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, pod kątem zawartości substancji psychotropowych. Badania te zostały wykonane w ramach współpracy z Pracownią Toksykologii ZMS UJ CM i Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Jagiellońskiego.

3. WPROWADZENIE

Przedmiot badań stanowiły leki psychotropowe, takie jak trójpierścieniowe leki przeciwdepresyjne (TLPD), benzodiazepiny (BZD), selektywne inhibitory wychwytu zwrotnego serotoniny (SSRI) oraz serotoniny i noradrenaliny (SNRI), a także leki z grupy „Z”. TLPD wprowadzono do leczenia w 50. XX wieku, mają działanie przeciwdepresyjne, lecz ze względu na względnie wysoką toksyczność (np. kardiotoxyczność), są coraz rzadziej stosowane. BZD redukują lub znoszą przejawy lęku, mogą działać nasennie, uspokajająco, przeciwdrgawkowo czy miorelaksacyjnie. Są powszechnie stosowanymi lekami o niskim indeksie terapeutycznym. Mimo tego, cechują się dużym potencjałem uzależniającym i mogą powodować rozwój tolerancji. Lekami nowej generacji stosowanymi w stanach depresyjnych są SSRI i SNRI. Są dobrze tolerowane przez organizm i charakteryzują się niewielką toksycznością. Leki „Z” są stosowane w zaburzeniach psychicznych, przede wszystkim jako leki nasenne.

Decyzja o wyborze właściwego materiału biologicznego do badań chemiczno – toksykologicznych jest bardzo ważnym etapem rozpoczynającym analizę. Od niego zależą kolejne czynności takie jak wstępne przygotowanie materiału do badań czy wybór techniki izolacji analitów z matrycy. Badania doświadczalne wykonywane w niniejszej pracy dotyczą próbek płynu z jamy ustnej, płynu łzowego oraz krwi.

Ze względu na obecność białek, soli, fosfolipidów oraz pozostałych składników matrycy biologicznej, które mogą wykazywać podobne właściwości do badanych analitów, niezmiernie ważne jest, aby prawidłowo dobrać sposób przygotowania próbek biologicznych do analizy [1,2]. Jednym z takich sposobów jest ekstrakcja, której celem jest izolacja analitów z próbek, usunięcie substancji przeszkadzających (tzw. interferentów), mogących zakłócać przebieg analizy, przekształcenie analitów w odpowiednią formę, która pozwoli lub ułatwi ich rozdzielenie, wykrycie, identyfikację i oznaczenie, a w przypadku metody charakteryzującej się niewystarczającą czułością, wzbogacenie analitu [2].

Aktualny trend w opracowywaniu technik ekstrakcyjnych skupia się na zmniejszeniu ilości próbki i zużywanych rozpuszczalników, skróceniu czasu procedury analitycznej oraz obniżeniu kosztów analizy. Nacisk położony jest w szczególności na mechanizację i automatyzację technik ekstrakcji, możliwość pracy w trybie on-line oraz miniaturyzację [1,3,4]. W przedstawionej rozprawie zastosowano mikroekstrakcję na upakowanym sorbencie (MEPS – *Microextraction By Packed Sorbent*), która jest nowoczesną i przyjazną środowisku techniką

ekstrakcji oraz ekstrakcję do fazy stałej (SPE – *Solid Phase Extraction*). Do identyfikacji i oznaczania leków psychotropowych w materiale biologicznym zastosowano następujące techniki separacyjne: chromatografię cieczową i elektroforezę kapilarną, połączone z detekcją spektrofotometryczną lub spektrometrią mas [5–11]: HPLC-UV, UHPLC-MS, LC-MS-MS, CE-UV.

4. WYNIKI

W ramach prowadzonych badań opracowano siedem procedur analitycznych służących do oznaczania ww. grup leków psychotropowych w dwóch materiałach alternatywnych: płynie z jamy ustnej i płynie łzowym oraz w jednym materiale podstawowym: krwi.

Rozpoczynając badania uwagę skupiono na opracowaniu sposobu przygotowania płynu z jamy ustnej do ekstrakcji MEPS testując w tym celu wirowanie, próbówki Salivette, filtrację i ultradźwięki. Analizy prowadzono stosując HPLC-UV. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały, iż najlepsze warunki wstępnego przygotowania płynu z jamy ustnej do ekstrakcji MEPS cechują procedurę, w której zastosowano działanie ultradźwiękami przez czas 50 minut i wirowanie w obniżonej temperaturze. Procedura ta została zastosowana w dalszych badaniach płynu z jamy ustnej.

Doświadczenia kontynuowano stosując metodę MEPS/UHPLC-MS, co pozwoliło na zwiększenie czułości wcześniej opracowanej metody (MEPS/HPLC-UV). Opracowaną i zwalidowaną metodę MEPS/UHPLC-MS zastosowano do analizy autentycznego materiału biologicznego. W próbkach pobranych od wolontariuszy wykryto i oznaczono amitryptylinę i jej metabolit nortryptylinę oraz doksepinę i metabolit nordoksepinę, co potwierdziło przydatność zmodyfikowanej metodyki postępowania do celów kliniczno – sądowych.

W badaniach przetestowano także przydatność CE-UV do analizy płynu z jamy ustnej pod kątem oznaczania TLPD. W rozprawie przedstawiono optymalizację warunków rozdzielania analitów, sprawdzając wpływ następujących parametrów: pH elektrolitu podstawowego (bufory fosforanowe o pH 2,5 i 6,2), dodatek β -cyklodekstryny (cztery poziomy stężenia: 5, 10, 15, 20 mM) dla każdego pH i temperaturę rozdzielania (20, 25, 30°C) dla wybranych wartości pH i stężenia modyfikatora. Po przeprowadzonych doświadczeniach wybrano optymalne warunki rozdzielania leków TLPD: elektrolit podstawowy zawierający modyfikator polianionowy i 75 mM bufor fosforanowy o pH 2,5, 10 mM dodatek β -cyklodekstryny, temperaturę rozdzielania 30°C. Próbkę biologiczną przygotowano do analizy wirując ją w obniżonej temperaturze (5 min, 16000 obr/min, 4°C) przez 5 minut. Na koniec zbierano

ciecz z nad osadu i ponownie wirowano w takich samych warunkach. Procedura ta okazała się być wystarczająca, a izolacja analitów z próbek nie była konieczna. Bezpośrednie oznaczanie analitów w próbkach znacznie uprościło tok postępowania i skróciło przebieg całej analizy. Przeprowadzone badania pokazały, iż elektroforeza kapilarnej cechuje się dużym potencjałem, który można rozwijać w kierunku analiz kliniczno-toksykologicznych, szczególnie pod względem możliwości bezpośredniego oznaczania analitów w próbce. Ograniczeniami metody CE-UV są niska czułość detektora i wysokie granice LOD i LOQ, które uniemożliwiają wykrycie badanych leków obecnych w płynie z jamy ustnej na poziomach terapeutycznych [12,13], dlatego dalsze badania powinny mieć na celu modyfikację metody w taki sposób by zwiększyć czułość detektora np. przez zastosowanie spektrometru mas.

Kolejny etap badań obejmował opracowanie i zoptymalizowanie ekstrakcji MEPS benzodiazepin z płynu z jamy ustnej, a także porównanie dwóch trybów wykonywania ekstrakcji MEPS: manualnego (off-line) i mechanicznego (z zastosowaniem pompy eVol®XR). Początkowo opracowano i zoptymalizowano procedurę ekstrakcji MEPS dla leków BZD, kolejno przeprowadzono serię ekstrakcji próbek płynu z jamy ustnej dotowanych badanymi lekami wyznaczając wydajności i powtarzalności procesu ekstrakcji przeprowadzanego manualnie. Następnie opracowaną i zoptymalizowaną procedurę przystosowano do trybu zmechanizowanego. Badania wykazały, iż wydajności ekstrakcji wykonanej za pomocą pompy eVol są większe niż w przypadku manualnej wersji MEPS. Na tej podstawie uznano, że proces ekstrakcji prowadzony z zastosowaniem systemu do ekstrakcji eVol®XR jest efektywniejszy. Co więcej, osiągnięto poprawę parametrów ekstrakcji (W, CV), a żywotność sorbentów BIN® zwiększyła się, co pozwoliło obniżyć koszty ekstrakcji. Do dalszych badań wybrano zatem tryb mechaniczny. Po przeprowadzonej walidacji metody MEPS/UHPLC-MS wykonano analizę próbek autentycznych, w których wykryto i oznaczono leki z grupy benzodiazepin. Wykazano, że metoda MEPS/UHPLC-MS może stać się przydatnym narzędziem w analizach kliniczno-sądowych.

Ostatni etap badań analizy płynu z jamy ustnej dotyczył oznaczania leków SSRI i SNRI. Do wyosabniania analitów z próbek płynu z jamy ustnej zastosowano metodę UHPLC-MS. W pierwszej kolejności skupiono uwagę na opracowaniu procedury ekstrakcyjnej MEPS dla leków SSRI i SNRI. Proces izolacji analitów z próbek prowadzono za pomocą zestawu ekstrakcyjnego eVol®XR. Sprawdzone wpływy różnych roztworów na etapach kondycji, przemywania sorbentu i elucji analitów, testując dwa rodzaje sorbentów. Decyzję

o optymalnych warunkach izolacji analitów podjęto na podstawie uzyskanych wydajności ekstrakcji.

Wiarygodność metody MEPS/UHPLC-MS do oznaczania leków z grup SSRI i SNRI w próbkach płynu z jamy ustnej potwierdzono wyznaczając jej parametry walidacyjne. Okazało się, że uzyskiwane wyniki oznaczeń są precyzyjne i dokładne (wyjątek stanowi sertralina), a metoda cechuje się niskimi granicami LOD i LOQ oraz selektywnością wobec badanych leków. By potwierdzić przydatność opracowanej metody w praktyce laboratoryjnej, przeprowadzono analizę dziewięć autentycznych próbek płynu z jamy ustnej pobranych od pacjentów Oddziału Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. W sześciu próbkach wykryto i oznaczono wenlafaksynę, w jednej próbce – paroksetynę, a w dwóch wykryto sertralinę. Ze względu na niesatysfakcjonującą dokładność oznaczeń tego leku nie podano wyniku analizy ilościowej.

Drugim alternatywnym materiałem biologicznym, jaki poddano analizie w trakcie wykonywanych doświadczeń był płyn łzowy. Opracowano metodę analizy tego materiału z zastosowaniem techniki MEPS i UHPLC-MS. Sposób przygotowania próbek płynu łzowego do mikroekstrakcji MEPS (z zastosowaniem systemu eVol) okazał się znacznie prostszy i krótszy w porównaniu do metodyki przygotowywania próbek płynu z jamy ustnej i obejmował jedynie proces wirowania w obniżonej temperaturze.

Opracowaną wcześniej procedurę ekstrakcyjną MEPS do benzodiazepin zmodyfikowano ze względu na niewielką objętość ekstrahowanej próbki (30 μ l), zmieniając objętości stosowanych roztworów na mniejsze. Dzięki temu zabiegowi zużywano około 360 μ l odczynników (40% mniej niż w przypadku ekstrakcji MEPS benzodiazepin z płynu z jamy ustnej i zasadniczo mniej niż w klasycznej technice SPE) do przeprowadzenia ekstrakcji jednej próbki. Cechy tej procedury sprawiły, iż izolacja analitów stała się bardzo szybka i łatwa do przeprowadzenia oraz ekonomiczna, gdyż zmniejszenie objętości stosowanych cieczy wpłynęło w znaczący sposób na poprawę żywotności sorbentów BIN®, a to obniżyło koszty wykonywanych analiz. Ta charakterystyka wskazuje, iż metodę MEPS/UHPLC-MS można zaliczyć do nurtu „zielonej chemii” [14].

Sprawdzoną metodę z powodzeniem zastosowano do analizy próbki autentycznej. Niemniej jednak, należałoby przeprowadzić analizę większej ilości próbek materiału autentycznego by potwierdzić przydatność opracowanej metody w laboratoriach klinicznych i sądowych. Z drugiej strony przeprowadzone badania wykazały, iż z dużą łatwością można

zastosować płyn łzowy, jako alternatywny materiał biologiczny w tego typu analizach. Prosty skład matrycy próbek sprawia, iż przeprowadzenie ekstrakcji próbek, jak i całej analizy, jest łatwiejsze niż próbek płynu z jamy ustnej, a interpretacja otrzymanych wyników staje się mniej skomplikowana niż np. w przypadku próbek krwi.

Przeprowadzono także badania nad oznaczaniem benzodiazepin (20 związków) i leków „Z” (3 związki) w próbkach krwi. Ekstrakcja do fazy stałej SPE posłużyła do wyosabniania analitów z matrycy biologicznej, natomiast do analizy instrumentalnej zastosowano chromatografię cieczową z tandemową spektrometrią mas.

Badania walidacyjne wykazały zadowalającą powtarzalność analiz prowadzonych zarówno w ciągu jednego dnia jak i kilku dni dla większości analitów, wyjątek stanowią oznaczenia zopiklonu i klobazamu. Dokładność metody jest zadowalająca, lecz w przypadku oznaczeń klobazamu jest nieakceptowalna i na tej podstawie wykluczono wykonywanie analiz ilościowych tego leku w próbkach krwi opracowaną metodą. Mimo to metoda bardzo dobrze nadaje się do wykrywania tego leku.

Największą trudnością, jaką zaobserwowano po przeprowadzeniu walidacji metody był znaczący wpływ matrycy próbki na wyniki oznaczeń. Problem rozwiązano stosując deuterowane pochodne analitów jako wzorce wewnętrzne i obliczając wartość efektu matrycy stosując względne wartości sygnałów analitycznych. W przypadku analitów, do których zastosowano inne deuterowane związki, nie zaobserwowano poprawy wyników, choć wyjątek stanowił zopiklon.

Opracowana metoda SPE/LC-MC-MC znalazła praktyczne zastosowanie w analizie próbek autentycznych, a uzyskane wyniki posłużyły do opiniowania sądowo-lekarskiego. W autentycznych próbkach krwi poddanych analizie wykryto i oznaczono midazolam i nordiazepam (oba na poziomie terapeutycznym) oraz estazolam (w stężeniu znacznie przekraczającym wartość terapeutyczną we krwi).

Na zakończenie badań wykonano analizy próbek płynu z jamy ustnej i krwi (jako materiału odniesienia) pobranych od pacjentów Pododdziału Chorób Afektywnych Oddziału Psychiatrii Dorosłych Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie. Zamierzeniem tego eksperymentu było wykazanie przydatności dwóch opracowanych metod analitycznych: MEPS/UHPLC-MS do oznaczania BZD w płynie z jamy ustnej i SPE/LC-MS-MS do oznaczania BZD we krwi.

Kwalifikując pacjentów do badań, lekarz brał pod uwagę rodzaj przyjmowanych leków przeciwdepresyjnych (BZD) i czas ich przyjmowania (minimum 2 tygodnie). W efekcie zakwalifikowano 9 pacjentów (P1 – P9): cztery kobiety w wieku 25 – 51 lat i pięciu mężczyzn w wieku 24 – 48 lat.

Według danych zawartych w formularzach, u pacjentów zdiagnozowano następujące choroby i zaburzenia związane z niepokojącym stanem psychicznym: schizofrenie paranoidalną, schizofrenie paranoidalną z komponentą depresyjną, organiczne zaburzenie dysocjacyjne, ograniczenie zaburzeń osobowości, zaburzenia depresyjne nawracające, epizod depresji umiarkowanej, epizod ciężkiej depresji z objawami psychotycznymi oraz epizod depresji ciężkiej bez objawów psychotycznych. W celu leczenia pacjentów P1 – P9 do terapii włączono preparaty leków z grupy benzodiazepin: Relanium (substancja aktywna – diazepam) i Lorafen (substancja aktywna – lorazepam). Zastosowanie opracowanych metod pozwoliło na oznaczenie lorazepamu w czterech próbkach krwi i oznaczenie diazepamu w czterech próbkach płynu z jamy ustnej i krwi, co więcej, w próbkach krwi oznaczono również metabolit diazepamu – nordiazepam.

Porównano wartości stężeń diazepamu w obu materiałach autentycznych i stwierdzono korelację o charakterze liniowym. Uzyskane wartości stężeń świadczą, że stężenia diazepamu w płynie z jamy ustnej w stosunku do krwi są około 20 razy mniejsze. Wyznaczenie statystycznej korelacji wskazywałoby na reprezentatywne oznaczanie diazepamu w płynie z jamy ustnej w stosunku do krwi, i przyczyniłoby się do lepszego rozpoznania dystrybucji leków psychotropowych i ich metabolitów w organizmie człowieka. Z tego powodu prowadzenie dalszych badań w tym kierunku jest niezmiernie ciekawe i istotne z punktu widzenia zalet płynu z jamy ustnej, jako alternatywnego materiału biologicznego.

5. WNIOSKI

Badania zmierzały do opracowania i weryfikacji metod dla celów ekspertyzy toksykologicznej biorąc pod uwagę analizę próbek autentycznych z przypadków klinicznych trzech materiałów biologicznych: płyn z jamy ustnej, płyn łzowy i krew. Pozwoliło to na sformułowanie następujących wniosków:

1. Spośród trzech metod oznaczania TLPD w próbkach płynu z jamy ustnej, najbardziej odpowiednia do tego celu okazała się metoda MEPS/UHPLC-MS. Jej przydatność zweryfikowano przeprowadzając analizę próbek autentycznych.

2. Mimo, iż metoda MEPS/UHPLC-MS nadaje się do wykrywania i identyfikacji sertraliny w próbkach płynu z jamy ustnej, to oznaczenie tego leku nie jest możliwe ze względu na niezadawalającą dokładność.
3. Opracowanie metody CE-UV oznaczenia leków z grupy TLPD wprost w próbkach biologicznych pozwoliło ominąć czaso- i pracochłonny etap izolacji analitów. Ponadto, badania wskazują, że elektroforeza kapilarna posiada znaczący potencjał w oznaczaniu leków psychotropowych w próbkach płynu z jamy ustnej, co daje nowe możliwości w porównaniu z rutynowo stosowanymi metodami chromatograficznymi.
4. Opracowano metodę MEPS/UHPLC-MS oznaczania benzodiazepin w próbkach płynu śluzowego, którą zastosowano w analizie próbek autentycznych z zadowalającym rezultatem.
5. Wykazano, iż stosowanie deuterowanych pochodnych analitów, jako ich wzorców IS, pozwala obniżyć wpływ efektu matrycy.
6. Jakkolwiek wykazano korelację między stężeniem diazepamu w próbkach płynu z jamy ustnej, a stężeniem diazepamu w próbkach krwi, to badania te wymagają dalszego dopracowania.

Prace analityczne nad mikroekstrakcją na upakowanym sorbencie skłaniają do wnioskowania:

7. MEPS umożliwia szybką izolację substancji psychotropowych z próbek biologicznych, z satysfakcjonującą wydajnością, a stosowanie małych objętości próbek dedykuje MEPS do materiałów alternatywnych, które pobierane są w niewielkich ilościach.
8. Ograniczeniem MEPS są stosunkowo drogie sorbenty BIN® i zależność liczby przeprowadzonych ekstrakcji od żywotności sorbentu, która z kolei zależy od złożoności matrycy próbki. Dodatkowo istnieje możliwość wykonywania ekstrakcji tylko jednej próbki w danym czasie.
9. Mechanizacja procesu MEPS i zaprojektowanie stolika do zestawu eVol®XR usprawniło i poprawiło jakość pracy analityka i wpłynęło na ograniczenie wpływu tzw. czynnika ludzkiego.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] R. Wietecha-Posłuszny, A. Garbacik, M. Woźniakiewicz, A. Moos, M. Wieczorek, P. Kościelniak, Application of microextraction by packed sorbent to isolation of psychotropic drugs from human serum, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2249–2257.
- [2] E. Jagerdeo, M. Abdel-Rehim, Screening of cocaine and its metabolites in human urine samples by direct analysis in real-time source coupled to time-of-flight mass spectrometry after online preconcentration utilizing microextraction by packed sorbent, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 20 (2009) 891–899.
- [3] L. Nováková, H. Vlcková, A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation, *Anal. Chim. Acta.* 656 (2009) 8–35.
- [4] S. Rani, A. Kumar, A.K. Malik, B. Singh, Quantification of tricyclic and nontricyclic antidepressants in spiked plasma and urine samples using Microextraction in Packed Syringe and analysis by LC and GC-MS, *Chromatographia.* 74 (2011) 235–242.
- [5] H.H. Maurer, Advances in analytical toxicology: The current role of liquid chromatography mass spectrometry in drug quantification in blood and oral fluid, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 110–118.
- [6] N. Anastos, N.W. Barnett, S.W. Lewis, Capillary electrophoresis for forensic drug analysis: A review, *Talanta.* 67 (2005) 269–279.
- [7] H.H. Maurer, Multi-analyte procedures for screening for and quantification of drugs in blood, plasma, or serum by liquid chromatography-single stage or tandem mass spectrometry (LC-MS or LC-MS/MS) relevant to clinical and forensic toxicology, *Clin. Biochem.* 38 (2005) 310–318.
- [8] M. a Alabdalla, HPLC-DAD for analysis of different classes of drugs in plasma, *J. Clin. Forensic Med.* 12 (2005) 310–315.
- [9] A. Plenis, T. Bączek, Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids, *Biomed. Chromatogr.* 25 (2011) 164–198.
- [10] C. Cruces-Blanco, A.M. García-Campaña, Capillary electrophoresis for the analysis of drugs of abuse in biological specimens of forensic interest, *Trends Anal. Chem.* 31 (2012) 85–95.
- [11] K. Madej, P. Kościelniak, Review of analytical methods for identification and determination of phenothiazines and tricyclic antidepressants, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 38 (2008) 50–66.
- [12] E. Chudzikiewicz, P. Adamowicz, M. Kała, W. Lechowicz, E. Pufał, M. Sykutera, et al., Possibilities of using saliva for testing drivers for estazolam, doxepin and promazine, *Probl. Forensic Sci.* LXII (2005) 166–177.

- [13] A. de Castro, M. Concheiro, O. Quintela, A. Cruz, M. López-Rivadulla, LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma. Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 48 (2008) 183–193.
- [14] J. Curyło, W. Wardencki, J. Namieśnik, Green aspects of sample preparation - a need for solvent reduction, *Polish J. Environ. Stud.* 16 (2007) 5–16.