

Mikroekstrakcija čvrstom fazom – inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima

A. Mornar,^{a*} I. Marinac-Andić,^{a,b} D. Amidžić Klarić^a i J. Kovačić^a

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



^a Zavod za analitiku i kontrolu lijekova, Farmaceutsko-biokemijski fakultet

Sveučilišta u Zagrebu, A. Kovačića 1, 10 000 Zagreb, Hrvatska

^b Pliva Hrvatska, Prilaz baruna Filipovića 25, 10 000 Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Tijekom posljednja tri desetljeća mikroekstrakcija čvrstom fazom donijela je značajan napredak u bioanalitičkim istraživanjima. Razlog tome su brojne modifikacije tehnike koje su omogućile njezinu primjenjivost za raznovrsne i složene biološke uzorke, ali i ekološku prihvatljivost. Tehnika se primjenjuje u kombinaciji s različitim analitičkim instrumentima među kojima se posebno ističu tekućinska i plinska kromatografija. Ovo pregledno istraživanje usmjereno je na najnovija dostignuća i načine primjene mikroekstrakcije čvrstom fazom. Nadalje, posebno su istaknuta nova, inovativna rješenja koja trenutačno nemaju komercijalnu primjenu.

Ključne riječi

Bioanalitika, priprema uzoraka, mikroekstrakcija čvrstom fazom, terapijsko praćenje lijekova

1. Uvod

Analitičke tehnike koje se primjenjuju u bioanalitici ubrajaju se u napredne instrumentalne tehnike. Spektroskopski testovi, imunološki testovi te elektrokemijske metode zadovoljavaju kriterije brzog probira kao i primjene u rutinskim analizama. S druge strane, za postizanje visoke selektivnosti te prikladne osjetljivosti metode primjenjuje se vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*, LC/MS). Nešto rjeđe se primjenjuju druge separacijske tehnike, poput vezanog sustava plinske kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Gas Chromatography Mass Spectrometry*, GC/MS) te kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije (engl. *Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry*, CE/MS). Vezani sustav superkritične kromatografije i masene spektrometrije (engl. *Supercritical Chromatography Mass Spectrometry*, SFC/MS) također se primjenjuje u bioanalitici, premda iznimno rijetko.¹⁻³

Uz primjenu naprednih instrumentalnih tehnika kao preduvjeta dobivanja pouzdanih rezultata mjerenja potrebno je istaknuti i tehnike pripreme složenih i raznovrsnih bioloških uzoraka. Priprema i analiza bioloških uzoraka iznimno je izazovna budući da su analiti (endogene i egzogene tvari kao i njihovi metaboliti) prisutni u tragovima, dok je matrica bogata brojnim interferirajućim tvarima koje ometaju analitičke postupke. Nadalje, od bioanalitičkih laboratorija očekuje se da primjenjuju načela zelene kemije te u rutinsku primjenu implementiraju ekološki prihvatljive analitičke postupke. S obzirom na visoke cijene nabave i održavanja napredne analitičke opreme jedan od izazova stavljenih pred bioanalitičke laboratorije je smanjenje troškova pripreme uzorka kao i skraćivanje ukupnog vremena analize.

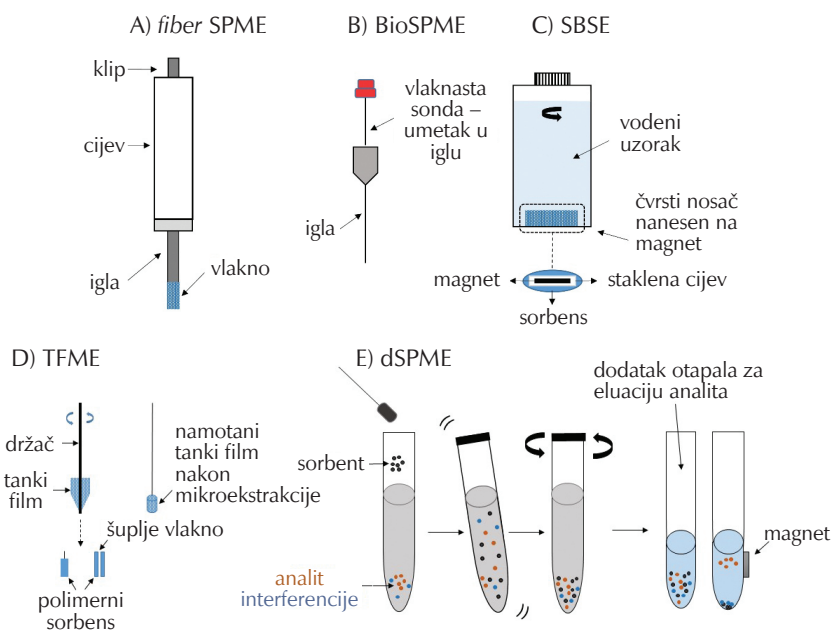
Stoga nije iznenađujuće da se klasične tehnike pripreme uzoraka kao što su ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid-Phase Extraction*, SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid-Liquid Extraction*, LLE) sve češće zamjenjuju ekološki prihvatljivim tehnikama mikroekstrakcije prilagođenim za uzorkovanje malih volumena uzoraka kao i primjenu u rutinskim analizama.⁴

Cilj ovog istraživanja je kritički razmotriti trenutačna dostignuća naprednih tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom (engl. *Solid-Phase Microextraction*, SPME) koje se primjenjuju u pripremi bioloških uzorka. Istraživanje je posebno usmjereno na metode koje se primjenjuju u određivanju terapijske doze lijekova, ispitivanju njihove farmakokinetike te metabolizma, ali i na metode kojima se ispituju biomarkeri različitih bolesti kao velik potencijal u ranj di-jagnostici. Budući da se radi o dinamičnom području, cilj ovog preglednog istraživanja bio je i ispitati daljnji potencijal tehnika ne samo u smislu osmišljavanja novih inovativnih sorbensa, visoko selektivnih i robusnih, već i najnovijih tehnoloških rješenja.

2. Osnovna načela i klasifikacija tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi

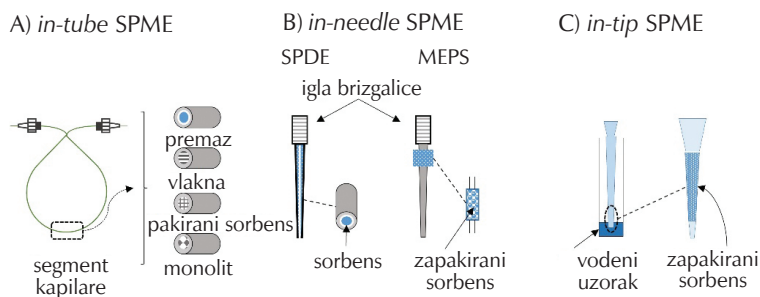
Tehnika SPE osmišljena je za brzu i selektivnu pripremu složenih uzoraka kod koje se analit otopljen ili suspendiran u tekućem uzorku odvajaju od ostalih sastavnica uzorka na temelju njegovih fizikalno-kemijskih svojstava. Iako je SPE široko primijenjena u bioanalitičkim ispitivanjima, nedostatci poput niske ekstrakcijske učinkovitosti, slabe ponovljivosti, otežane automatizacije postupka, kao i ekološke i ekonomske neprihvatljivosti, doveli su do razvoja raznovrsnih tehnika mikroekstrakcije na čvrstoj fazi kao inovativnih rješenja za prevladavanje spomenutih nedostataka.⁵

* Autor za dopisivanje: Prof. dr. sc. Ana Mornar
e-pošta: amornar@pharma.hr



Slika 1 – Prikaz tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem: *fiber* SPME (A), BioSPME (B), SBSE (C), TFME (D) i dSPME (E)

Fig. 1 – Different types of stirring mediated solid-phase microextraction techniques: *fiber* SPME (A), BioSPME (B), SBSE (C), TFME (D) and dSPME (E)



Slika 2 – Prikaz tehnika mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane protokom: IT-SPME (A), *in-needle* SPME (B) i *in-tip* SPME (C)

Fig. 2 – Different types of flow-through mediated solid-phase extraction techniques: IT-SPME (A), *in-needle* SPME (B) and *in-tip* SPME (C)

Mikroekstrakciju čvrstom fazom uveo je J. Pawliszyn 1987. godine, što se može smatrati početkom novog pristupa u pripremi bioanalitičkih uzoraka budući da je uzorkovanje, ekstrakcija i ukoncentriravanje analita provedeno u jednom koraku.⁴ Prva izvedba tehnike temeljila se na adsorpciji analita izravno iz vodenih uzoraka na vlakno izrađeno od kvarcnog stakla presvučenog sorbentsom. To znači da se mala količina ekstrakcijske faze, tj. sorbensa kojim je obloženo vlakno, izlaže uzorku u unaprijed određenom razdoblju. Proces mikroekstrakcije smatra se dovršenim kad se postigne ravnoteža raspodjele analita između matrice uzorka i sorbensa kojim je obloženo vlakno. Jedan od ključnih čimbenika zbog kojih je tehnika našla široku primjenu u bioanalitičkim ispitivanjima je njezina kompatibilnost s naprednim instrumentalnim tehnikama poput tehnika LC/MS i GC/MS.^{6,7}

Mikroekstrakcijske tehnike na čvrstoj fazi na temelju mehanizma difuzije dijele se u dvije skupine: tehnike mikro-

ekstrakcije posredovane miješanjem (engl. *Stirring Mediated Solid-Phase Microextraction*) ili protokom (engl. *Flow Through Mediated Solid-Phase Microextraction*) (slike 1 i 2).

Nadalje, kod mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem odnosno statičkih tehnika čvrsti nosač može biti smješten na magnetu (engl. *Stir-Bar Sorptive Microextraction*, SBSE) ili je u obliku vlakna (engl. *Fiber Solid-Phase Microextraction*, *fiber* SPME) odnosno tankog filma (engl. *Thin Film Solid-Phase Microextraction*, TFME) te u obliku praška (engl. *dispersive Solid-Phase Microextraction*, dSPME) (slika 1). Podjela tehnika posredovanih protokom, odnosno dinamičkih tehnika, također se temelji na smještaju čvrstog nosača: u koloni (engl. *in-tube Solid-Phase Microextraction*, IT-SPME), u igli (engl. *in-needle Solid-Phase Microextraction*, *in-needle* SPME) ili u nastavku za automatske pipete (engl. *in-tip Solid-Phase Microextraction*, *in-tip* SPME) (slika 2).

2.1. Tehnike mikroekstrakcije posredovane miješanjem

2.1.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno

Mikroekstrakcija čvrstom fazom s nosačem nanesenim na vlakno (*fiber* SPME) smatra se jednom od prvih razvijenih mikroekstrakcijskih tehnika. Osnovni dio pribora sastoji se od igle brizgalice unutar koje je smješteno vlakno obloženo sorbentsom (slika 1A). Ekstrakcijski postupak počinje postavljanjem vlakna u uzorak te raspodjelom analita između uzorka i sorbensa. S obzirom na položaj vlakna u odnosu na uzorak, tehnika se dijeli na dva izvedbena formata. Ako je vlakno neposredno izloženo tekućem uzorku, tad se govori o direktnoj *fiber* SPME tehnici (engl. *Direct Immersion – Solid-Phase Microextraction*, DI-SPME) odnosno ako se vlakno postavlja iznad tekućeg ili krutog uzorka izloženog povišenoj temperaturi, tad se govori o indirektnoj *fiber* SPME tehnici (engl. *Headspace – Solid-Phase Microextraction*, HS-SPME). Nakon postizanja ravnotežne raspodjele analita između uzorka i sorbensa vlakno se uklanja iz uzorka te se započinje s desorpcijom analita sa sorbensa. Desorpcija se provodi ili termalno ili prikladnim otapalom, ovisno o svojstvima analita kao i tehnici odabranoj za njegovu analizu.

U odnosu na standardne tehnike pripreme uzorka SPE i LLE, glavne prednosti tehnike *fiber* SPME su jednostavnost i brzina izvođenja te mogućnost automatizacije, što ju čini iznimno prikladnom za bioanalitička ispitivanja. Međutim, dostupnost raznovrsnih sorbensa ključni je čimbenik zbog kojeg ta tehnika nalazi široku primjenu u bioanalitici. Najčešće upotrebljavane vrste sorbensa u SPE, pa tako i u tehnici *fiber* SPME su modificirani silikagel, polimeri i materijali na bazi ugljika. Međutim, zbog ograničenja poput fizičke i kemijske nestabilnosti pri niskim ili visokim pH vrijednostima, niskog kapaciteta i ograničene ponovne upotrebe tih konvencionalnih sorbensa, posljednjih nekoliko godina provedeno je mnoštvo istraživanja kako bi se razvila inovativna vlakna ponajprije s ciljem povećanja selektivnosti i ekstrakcijske učinkovitosti postupka *fiber* SPME (tablica 1).^{2,8}

Primjer takvih inovativnih sorbensa su polimeri s molekulskim otiskom (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) koje karakteriziraju prednosti poput jednostavnosti primjene, jedinstvenih svojstava poput kemijske odnosno mehaničke stabilnosti, visoke selektivnosti i mogućnosti višekratne upotrebe. Pripremaju se reakcijom molekule predloška i odgovarajućeg monomera u prisutnosti sredstva za unakrsno povezivanje kako bi nastale "šupljine" za selektivno prepoznavanje otisnute molekule nakon procesa polimerizacije.^{8,9}

Tablica 1 – Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima su za pripremu uzorka primijenjene tehnike mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane miješanjem

Table 1 – Examples of stirring mediated solid-phase microextractions in bioanalytical sample preparation

Priprava uzorka Sample preparation	Analit Analyte	Uzorak Sample	Sorbens Sorbent	Analitička tehnika Analytical technique	Ekstrakcijska učinkovitost/% Extraction efficiency/%	Lit.
<i>fiber</i> SPME	amoksisilin, ciprofloksacin, flukonazol, gentamicin, klindamicin, linezolid, metronidazol, moksifloksacin amoxicillin, ciprofloxacin, fluconazole, gentamicin, clindamycin, linezolid, metronidazole, moxifloxacin	plazma plasma	poli-3-metiltofien, politifen, polipirol poly(3-methylthiophene), polythiophene, polypyrrole	LC-MS/MS	65 – 80	10
<i>fiber</i> SPME	amoksisilin, cefotaksim, metronidazol i metaboliti amoxicillin, cefotaxime, metronidazole and metabolites	plazma plasma	3-metiltofien, 3-tiofene 3-methylthiophene, 3-thiophene	LC-MS/MS	–	11
<i>fiber</i> SPME	bromazepam, klonazepam, alprazolam, nordiazepam, diazepam bromazepam, clonazepam, alprazolam, nordiazepam, diazepam	plazma plasma	materijal ograničenog pristupa/ polimer s molekulskim otiskom restricted access molecularly imprinted polymers	HPLC-DAD	–	12
<i>fiber</i> SPME	lizofosfolipidi, trigliceridi, medijatori agregacije trombocita, metaboliti linolne kiseline lysophospholipids, triglycerides, aggregation thrombocyte mediators, linoleic acid metabolites	plazma plasma	modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima (C18) i benzensulfonskom kiselinom octadecyl and benzenesulfonic acid silica based	LC-MS	–	13
<i>fiber</i> SPME	aminokiseline, fosfogliceridi, eikozanoidi, masne kiseline amino acids, phosphoglyceride, eicosanoids, fatty acids	slina saliva	modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima (C18) i benzensulfonskom kiselinom octadecyl and benzenesulfonic acid silica based	LC-MS	–	15

Tablica 1 – (nastavak)
Table 1 – (continued)

Priprava uzorka Sample preparation	Analit Analyte	Uzorak Sample	Sorbens Sorbent	Analička tehnika Analytical technique	Ekstrakcijska učinkovitost / % Extraction efficiency / %	Lit.
fiber SPME	lako hlapljivi metaboliti u urinu volatile metabolites in human urine	urin urine	karboksen/polidimetilsiloksan carboxen/polydimethylsiloxane	HS-GC/MS	–	16, 17
BioSPME	triciklički antidepresivi tricyclic antidepressants	slina saliva	biokompatibilan materijal biocompatible material	DI-MS/MS	–	18
BioSPME	doksorubicin doxorubicin	pluća lungs	biokompatibilan materijal biocompatible material	LC/MS/MS	–	19
BioSPME	valproična kiselina valproic acid	serum serum	biokompatibilan materijal biocompatible material	GC/MS	–	20
SBSE	dietilstilbestrol, testosteron, metiltestosteron, progesteron, testosteron propionat, fenil-propionat diethylstilboestrol, testosterone, methyltestosterone, progesterone, testosterone propionate, phenyl propionate	urin urine	monolitni sorbens monolithic sorbent	HPLC-DAD	21 – 82	23
SBSE	kofein caffeine	plazma plasma	alkil-diol modificirani silikagel, materijal ograničenog pristupa alkyl-diol silica based restricted access material	HPLC-DAD	102	24
SBSE	mirtazapin, citalopram, paroksetin, duloksetin, fluoksetin, sertralin mirtazapine, citalopram, paroxetine, duloxetine, fluoxetine, sertraline	plazma plasma	polidimetilsiloksan /polipirol polydimethylsiloxane / polypyrrole	HPLC-DAD	38 – 83	25
TFME	peptidi, masne kiseline, lipidi, benzokain, paracetamol, kofein, kanabinoidi, steroidi, narkotici, β-blokatori, stimulansi, glukokortikoidi peptides, fatty acids, lipids, benzocaine, paracetamol, caffeine, cannabinoids, steroids, narcotics, β-blockers, stimulants, glucocorticoids	slina saliva	hidrofilno-lipofilne čestice hydrophilic-lipophilic balanced particles	LC/MS GC/MS	–	27
TFME	lako hlapljivi spojevi volatile compounds	sebum sebum	polidimetilsiloksan polydimethylsiloxane	GC/MS	–	28, 29
dSPME	tramadol, fluoksetin tramadol, fluoxetine	urin, kosa urine, hair	magnetske čestice s grafen oksidom graphene oxide magnetic dispersive particles	GC/MS	–	30
dSPME	steroidi steroids	plazma plasma	Magn-Humic	LC/MS/MS	–	31

Szultke i sur.¹⁰ sintetizirali su MIP sorbens za ekstrakciju tehnikom *fiber* SPME antimikrobnih lijekova koji su se pokazali učinkoviti u liječenju meticilin rezistentnog *Staphylococcus aureus* u punoj krvi pacijenata. Upotrijebili su tri vrste MIP sorbensa (polipirol, politiofen i poli-3-metiltiofen) kojima su oblagali SPME vlakna. Istraživanje je pokazalo da priređeni polimeri pokazuju različitu selektivnost za antibiotike te su lijekovi podijeljeni u tri skupine s obzirom na njihov afinitet prema MIP sorbensima. Upotrebom poli-3-metiltiofena postigla se najveća ekstrakcijska učinkovitost za amoksicilin, gentamicin i moksifloksacin, politiofena za cefotaksim, flukonazol i metronidazol te polipi-

rola za ciprofloksacin, klindamicin, daptomicin i linezolid (više od 60 %). Polimeri s molekulskim otiskom primjenom elektrokemijske polimerizacije priređeni su također za antibiotike amoksicilin, cefotaksim i metronidazol te njihove metabolite.¹¹

Jedan od čestih nedostataka sorbensa koji se primjenjuju kod tehnike *fiber* SPME je vezivanje makromolekula prisutnih u biološkim uzorcima na njihova vezna mjesta. Na taj način makromolekule zauzimaju vezna mjesta analitu, smanjuju ekstrakcijsku učinkovitost sorbensa te utječu na osjetljivost, točnost i preciznost metode. Da bi se izbjegao

taj nedostatak, u novije vrijeme sve češće se kao sorbensi upotrebljavaju materijali ograničenog pristupa (engl. *Restricted Access Material*, RAM) koji ciljano uklanjaju makromolekule (proteine i peptide) iz uzoraka. Male molekule ulaze u pore sorbensa i tamo stupaju u interakciju s funkcionalnim skupinama na površini pora, dok se velike molekule ispiru eluentom.

*Abrão i sur.*¹² pripremili su visoko selektivni sorbens koji kombinira mehanizme polimera s molekulskim otiskom i materijala ograničenog pristupa (engl. *Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers*, RAMIP) za ekstrakciju benzodiazepina iz bioloških tekućina. Taj napredni sorbens je hibridni materijal koji sadrže selektivno mjesto za vezanje predloška (odnosno analita) pripremljen pomoću diazepama kao molekule predloška i metakrilne kiseline kao monomera. Na taj sloj je unakrsno vezan vanjski hidrofilni sloj kojeg čini goveđi serumski albumin s ciljem sprječavanja vezanja proteina. Tako pripremljen sorbens upotrijebljen je za ekstrakciju benzodiazepina iz uzoraka plazme. Osim što se pokazao visoko selektivan i osjetljiv (granice dokazivanja (engl. *Limit of Detection*, LOD) bile su u rasponu od 5 do 30 $\mu\text{g l}^{-1}$), postignut je kapacitet uklanjanja proteina od visokih 98 %.

Kao što je vidljivo iz gore navedenih primjera kod terapijskog praćenja koncentracije lijeka potrebno je razviti pouzdanu analitičku metodu za određivanje koncentracije najčešće jednog analita u biološkom uzorku. S druge strane, cilj metaboličkih studija je praćenje što većeg broja bioloških markera te je upravo stoga izazov kod razvoja tih metoda primijeniti prikladan sorbens selektivan za skupinu analita.¹³ *Bojko i sur.*¹⁴ prikazali su prednost primjene tehnika *fiber* SPME i LC/MS u metaboličkim ispitivanjima kod pacijenata podvrgnutih operaciji srca upotrebljavajući sorbens koji kombinira mehanizam ekstrakcije obrnutofaznog sorbensa i anionskog izmjenjivača (modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima i benzensulfonskom kiselinom). Primjenom predložene metode uočene su promjene u metaboličkim profilima: lizofosfolipida, triglicerida, medijatora agregacije trombocita i metabolita linolne kiseline izazvanih operacijom i primijenjenom farmakoterapijom (transeksaminska kiselina). To ispitivanje potvrdilo je da je tehnika *fiber* SPME brz i jednostavan alat za pripremu uzoraka te ga je u kombinaciji s naprednim analitičkim tehnikama moguće primijeniti kao brzi dijagnostički test.

Istu vrstu sorbensa upotrijebili su *Bessonneau i sur.*¹⁵ za ekstrakciju oko 400 hidrofobnih i hidrofilnih metabolita (aminokiseline, karboksilne kiseline, eikozanoidi, masne kiseline i fosfogliceridi) iz uzoraka sline. Istraživanje je pokazalo da kombinirani mehanizam navedenog sorbensa omogućava ekstrakciju većeg broja analita (više od 30 %) u odnosu na sorbens koji čini modificirani silikagel s vezanim alkilnim lancima.

Tehnika *fiber* SPME također je uspješno primijenjena za ekstrakciju lako hlapljivih metabolita iz urina pacijenata kao potencijalnih biomarkera tumora.^{16,17} U urinu pacijenata utvrđene su veće koncentracije derivata benzena, terpenoida, ketona, sumpornih spojeva i fenola u odnosu na uzorke urina kontrolne skupine. Kao sorbens za ekstrakciju izabran je karboksen/polidimetilsiloksan zbog njegova nepolarnog karaktera te mikropora prisutnih u sorbensu u

kojima se analiti manje molekulske mase zadržavaju bolje nego kod ostalih vrsta sorbensa.

Posljednjih godina komercijalno je dostupna tehnika BioSPME (slika 1B), koja predstavlja modifikaciju tehnike *fiber* SPME prilagođenu za *in vivo* monitoriranje koncentracije lijekova. Na taj način objedinjeni su koraci uzorkovanja i ekstrakcije analita. Tehnika je do sad uspješno primijenjena za ekstrakciju tricikličkih antidepersiva iz sline,¹⁸ doksorubicina iz plućnog tkiva¹⁹ i valproične kiseline iz seruma²⁰ s iznimno visokim ekstrakcijskim učinkovitostima (preko 95 %).

2.1.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbensom nanosenim na magnet

Mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbensom nanosenim na magnet ili adsorpcijska ekstrakcija magnetom (SBSE) je tehnika pripreme uzoraka koju je razvio *Baltussen* i njegova istraživačka grupa²¹ s ciljem povećanja učinkovitosti mikroekstrakcije čvrstom fazom. Kod te tehnike sorbens je postavljen na staklenu cijev u kojoj se nalazi magnet debljine od 0,3 do 1,0 mm (slika 1C). Postupak ekstrakcije provodi se tako da se sorbens na magnetu postavi u tekući uzorak koji se potom miješa primjenom magnetske miješalice dok se ne postigne ravnotežno stanje analita između sorbensa i uzorka. Nakon uklanjanja sorbensa iz uzorka desorpcija ekstrahiranog analita provodi se termičkim putem ili prikladnim otapalima, ovisno o svojstvima analita kao i instrumentalnoj tehnici namijenjenoj za njegovu analizu. Kod nekih modifikacija tehnike ekstrakcija se provodi tako da se sorbens nanosen na magnet postavi iznad tekućeg odnosno krutog uzorka izloženog povišenoj temperaturi (engl. *Headspace – Stir-Bar Sorptive Microextraction*, HS-SBSE). Ta tehnika ponajprije je namijenjena za ekstrakciju lako hlapljivih analita prisutnih u složenim matricama. Kao prvi sorbens upotrijebljen u pripremi tehnike SBSE bio je polidimetilsiloksan. Zbog izrazito nepolarnog karaktera taj sorbens je prikladan za ekstrakciju nepolarnih analita. Danas se upotrebljavaju različiti polimerni materijali poput polidimetilsiloksan/etilenglikol kopolimera, a u novije vrijeme dostupni su i monolitni sorbensi kao i polimeri s molekulskim otiskom. Da bi se sorbens zaštitio od fizičkih oštećenja, kod nekih modifikacija tehnike cijeli je sustav postavljen unutar inertnog mrežastog kućišta. Komercijalno su dostupni i sorbensi koji u dodiru s otapalom bubre (engl. *Solvent-Assisted Stir Bar Sorptive Microextraction*, SA-SBSE), što omogućava bolju adsorpciju analita na sorbens, a time i bolju osjetljivost metode. Upravo je taj sorbens namijenjen ekstrakciji polarnih analita čije su logaritamske vrijednosti raspodjele između *n*-oktanol i vode niže od 2. Selektivnost metode moguće je poboljšati i primjenom magneta na koji se nalaze dva različita sorbensa. Najčešće se kombiniraju sorbensi na bazi ugljika i polidimetilsiloksan. Kad se govori o prednostima te tehnike, potrebno je istaknuti i mogućnost istodobne ili uzastopne upotrebe nekoliko različitih nosača (engl. *Multi-Stir Bar Sorptive Microextraction*, ^mSBSE), a sve u svrhu postizanja visoke selektivnosti metode. Prilikom ekstrakcije kod koje se u uzorak postavlja istodobno više sorbensa nanosenih na magnet oni se smještaju uz unutarnju stijenku laboratorijske posude te se raspoređuju po njoj primjenom magnetnog obruča.

S obzirom na gore navedeno, moguće je zaključiti da je tehnika SBSE u odnosu na tehniku SPE iznimno jednostavna za izvođenje. Nadalje, primjenom tog mikroekstrakcijskog postupka moguće je postići i do 1000 puta niže vrijednosti granica određivanja (engl. *Limit of Quantitation*, LOQ) uz širok linearni raspon i ponovljivost ekstrakcijskog postupka. Kad se mogućnosti tehnike SBSE usporede s ostalim mikroekstrakcijskim tehnikama, potrebno je istaknuti da je moguće postići bolju osjetljivost metode i u usporedbi s tehnikom *fiber* SPME budući da je sloj sorbensa postavljenog na magnet i do 250 puta deblji od onog kod tehnike *fiber* SPME.²²

Premda je najveći nedostatak tehnike nemogućnost potpune automatizacije postupka pripreme uzoraka, ona je posljednjih godina našla svoju primjenu u bioanalitičkim istraživanjima (tablica 1).

Monolitni sorbensi visoko su porozni materijali koji sadrže mrežu međusobno povezanih pora mikrometarskih veličina. Stoga su *Huang i sur.*²³ pripremili monolitni materijal *in situ* kopolimerizacijom estera stearil-metakrilata i etil-dimetakrilata u prisutnosti porogenog otapala te su ga postavili na magnet. Na taj način postigli su ekstrakciju i polarnih i nepolarnih spojeva. Priređeni sorbens primijenili su za ekstrakciju spolnih hormona iz urina trudnih pacijentica. Međutim, dobivene ekstrakcijske učinkovitosti bile su u rasponu od niskih 21 % do visokih 82 % uz LOD vrijednosti u rasponu od 0,06 do 0,38 $\mu\text{g l}^{-1}$.

I RAM sorbens postavljen na magnet upotrijebljen je za ekstrakciju kofeina iz plazme štakora uz ekstrakcijsku učinkovitost od 102 %.²⁴ Prednost tog sorbensa je jednostavnost pripreme uzorka budući da proteine plazme nije potrebno ukloniti prije ekstrakcijskog postupka.

S druge strane, primjena polimernog sorbensa, koji se sastoji od dvije faze, polidimetilsiloksana i polipirola, omogućila je selektivnu ekstrakciju kao i prikladnu osjetljivost (LOD vrijednosti su bile između 5 i 20 $\mu\text{g l}^{-1}$) lijekova iz skupine antidepresiva iz plazme pacijenata.²⁵

2.1.3. Mikroekstrakcija tankim filmom

Mikroekstrakcija tankim filmom (TFME) razvijena je da bi se poboljšala osjetljivost analitičkih metoda. Naime, uočeno je da polidimetilsiloksan u obliku šupljeg vlakna ili tankog filma odnosno membrane velike površine ima veću ekstrakcijsku učinkovitost u odnosu na druge formate poput vlakna. Takvom izvedbom ekstrahira se veća količina analita iz uzorka u kraćem vremenu budući da ekstrakcijsko sredstvo ima visok omjer površine i volumena. Postupak se izvodi tako da se membrana uspravno pričvrsti na držač i kao takva postavi u uzorak. Nakon ekstrakcije membrana se namota oko držača i uvodi u plinski kromatograf, gdje se pod povišenom temperaturom desorbiraju ekstrahirani analiti (slika 1D). Takav pristup prikladan je za ekstrakciju hidrofobnih poluhlapljivih analita.^{7,26}

Tehnika TFME našla je ulogu u bioanalitičkim ispitivanjima budući da se može jednostavno prilagoditi za neinvazivna uzorkovanja biološkog materijala (tablica 1).

Primjer takovog istraživanja proveli su *Bessonneau i sur.*²⁷ te su primijenili TFME u formatu pločice odnosno membrane za ekstrakciju analita iz sline dobrovoljaca. Zbog velikog omjera površine i volumena ekstrakcijske faze samo pet minuta uzorkovanja *in vivo* uz pomoć tehnike TFME bilo je dovoljno za ekstrakciju velikog broja ksenobiotika i endobiotika različitih fizikalno-kemijskih svojstava uz izvrsnu osjetljivost metode (LOQ vrijednosti bile su u rasponu od 0,004 do 0,98 $\mu\text{g l}^{-1}$). Tehnika TFME otvorila je mogućnost istodobnom uzorkovanju i pripremi uzoraka za analizu, te uz primjenu prijenosnih analitičkih instrumenata ti analitički postupci mogli bi imati važnu ulogu u testiranjima na zlouporabu droge kao i otkrivanju dopinga.

Neinvazivan pristup uzorkovanju koji nudi tehnika TFME primijenjen je za izradu profila lako hlapljivih sastavnica ljudske kože u svrhu primjene u dijagnostici i liječenju raznih poremećaja.^{28,29} To rješenje zamjenjuje do sad primjenjivane invazivne pristupe (nalaz kulture brisa i eksudata rane te biopsije tkiva rane) koji često uzrokuju dodatna oštećenja kože. Sam postupak uzorkovanja prilično je jednostavan te uključuje izravno postavljanje membrane na površinu kože. Ipak, taj način uzorkovanja prate nedostatci poput kontaminacije uzorka te gubitka iznimno lako hlapljivih analita.

2.1.4. Disprezivna mikroekstrakcija čvrstom fazom

Disprezivna mikroekstrakcija čvrstom fazom (dSPME) metoda je koja je ponajprije prilagođena za nove inovativne sorbense te se najčešće primjenjuje u istraživačkim laboratorijima (slika 1E). Dodatno je potrebno istaknuti da za provedbu te vrste ekstrakcijskog postupka nije potrebna skupa laboratorijska oprema, već ona standardno prisutna u analitičkim laboratorijima. Postupak ekstrakcije provodi se izravnim dodatkom sorbensa u obliku praška u tekući uzorak. Prednost te tehnike je zasigurno velik omjer površine i volumena ekstrakcijske faze, što pozitivno utječe na ekstrakcijsku učinkovitost postupaka. Kao sorbensi se upotrebljavaju modificirani silikagel te raznovrsni polimeri. Nadalje, sorbensi mogu biti nanoseni i na magnetske čestice, što pojednostavljuje sam postupak ekstrakcije. Sorbensi koji posjeduju visok kapacitet apsorpcije, poput ugljikovih nanocijevčica, grafena i grafen oksida otkrivaju nove mogućnosti primjene tehnike dSPME. Da bi se osigurala pouzdanost tih ekstrakcijskih postupaka nakon pripreme čestica, potrebno ih je i fizikalno-kemijski okarakterizirati.⁹

Inovativni primjeri primjene tehnike dSPME u bioanalitici prikazani su u tablici 1. Tako su magnetske čestice Fe_3O_4 na koje je postavljen grafen oksid primijenjene za ekstrakciju tramadola i fluoksetina iz kose i urina,³⁰ dok su tzv. Magn-Humic čestice pripremljene pirolizom humične kiseline na silikagel za ekstrakciju steroida iz plazme.³¹ Osim što su se oba ekstrakcijska postupka pokazala iznimno jednostavnim, tim tehnikama postignute su iznimno niske LOD vrijednosti (manje od 0,8 $\mu\text{g l}^{-1}$).

2.2. Tehnike mikroekstrakcije posredovane protokom

2.2.1. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari

Mikroekstrakcija čvrstom fazom u kapilari (*in-tube* SPME) spada u mikroekstrakcije tehnike kod kojih je ekstrakcija analita posredovana protokom (slika 2A). Kod standardne tehnike *in-tube* SPME unutarnja stijenka otvorene kapilare od razvučenog kvarca obložena je sorbensom (engl. *open tubular capillary* IT-SPME) te se tijekom prolaska uzorka kroz kapilaru analit ekstrahira na sorbens. Za pouzdanu kvantitativnu analizu nije nužno postizanje ravnotežne raspodjele analita između uzorka i sorbensa. Osim opisanih *in-tube* SPME kolona dostupne su i kolone kod kojih je kapilara punjena česticama sorbensa (engl. *sorbent-packed capillary* IT-SPME), tankim vlaknima kao sorbensom (engl. *fiber-packed capillary* IT-SPME) odnosno monolitnim sorbensom (engl. *monolith capillary* IT-SPME). Pri izradi IT-SPME kapilara upotrebljavaju se raznovrsni sorbensi od standardnih nepokretnih faza koje se upotrebljavaju kod izrade kolona za plinsku kromatografiju do inovativnih sorbensa poput β -ciklodekstrina, polipirola, magnetskih nanočestica $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ te RAM i MIP sorbensa.³²

Kao glavna prednost tehnike IT-SPME ističe se njezina kompatibilnost s velikim brojem instrumentalnih tehnika. Štoviše, s nekim od njih je izvedivo i *on-line* povezivanje. Premda ono istiskuje nadogradnju postojeće analitičke

opreme, brojne su prednosti tog načina rada, od automatizacije postupka do veće ekološke prihvatljivosti kao i manje izloženosti analitičara organskim otapalima.^{7,33}

Upravo zbog navedenih prednosti tehnika *in-tube* SPME našla je primjenu u bioanalitičkim istraživanjima (tablica 2). Većina analitičara upotrebljava komercijalno dostupne kapilare za *on-line* povezivanje tehnika IT-SPME i LC za određivanje raznovrsnih endobiotika i ksenobiotika kao i njihovih metabolita u biološkim uzorcima poput hormona kortizola, dehidroepiandrosterona,³⁴ testosterona i anaboličkih steroida,^{35,36} lidokaina,³⁷ rifampicina,³⁸ nikotina i kotinina.³⁹ S druge strane, potrebno je istaknuti da za postizanje uspješne selektivnosti i osjetljivosti bioanalitičkih metoda pojedine skupine istraživača pripremaju nove sorbense kojima pune kapilare odnosno provode modifikacije postojećih sorbensa. Tako je priređen monolitni sorbens na bazi vinilpiridina za određivanje nesteroidnih protuupalnih lijekova ketoprofena, fenbufena i ibuprofena iz plazme.⁴⁰ *Hu i sur.*⁴¹ također su priredili monolitni sorbens kojim su punili kapilare od kvarcnog stakla. Tako pripremljena *in-tube* SPME kapilara upotrijebljena je za neposredno unošenje biološkog uzorka u maseni spektrometar te je bila sastavni dio ionizatora elektroraspršenjem. To istraživanje pokazalo je da tehnika *in-tube* SPME osigurava izvrsnu selektivnost analitičke metode za određivanje nesteroidnih protuupalnih lijekova ketoprofena i flurbipro-

Tablica 2 – Primjeri bioanalitičkih metoda u kojima su za pripremu uzorka primijenjene tehnike mikroekstrakcije čvrstom fazom posredovane protokom

Table 2 – Examples of flow-through mediated solid-phase extractions in bioanalytical sample preparation

Priprava uzorka Sample preparation	Analit Analyte	Uzorak Sample	Sorbens Sorbent	Analitička tehnika Analytical technique	Ekstrakcijska učinkovitost/% Extraction efficiency/%	Lit.
IT-SPME	kortizol, dehidroepiandrosteron cortisol, dehydroepiandrosterone	slina saliva	polimer divinilbenzena divinylbenzene polymer	LC-MS/MS	> 94	34
IT-SPME	testosteron testosterone	slina saliva	polimer divinilbenzena divinylbenzene polymer	LC-MS/MS	> 94	35
IT-SPME	anabolički steroidi anabolic steroids	urin urine	polimer divinilbenzena divinylbenzene polymer	LC-MS/MS	> 85	36
IT-SPME	lidokain i metabolit lidocaine and metabolite	plazma plasma	14 % cijanopropil-fenil- -metilpolisiloksan 14% cyanopropyl-phenyl- -methylpolysiloxane	HPLC-DAD	95 – 117	37
IT-SPME	rifampicin rifampicin	plazma plasma	polietilenglikol polyethylene glycol	HPLC-DAD	–	38
IT-SPME	nikotin, kotinin nicotine, cotinine	kosa hair	Carboxen 1006 PLOT	LC/MS/MS	–	39
IT-SPME	ketoprofen, fenbufen, ibuprofen ketoprofen, fenbufen, ibuprofen	plazma plasma	monolitni sorbens monolithic sorbent	LC-MS	88 – 112	40
IT-SPME	ketoprofen, flurbiprofen ketoprofen, flurbiprofen	plazma, urin plasma, urine	monolitni sorbens monolithic sorbent	DI-MS	86 – 119	41
IT-SPME	diklofenak diclofenac	urin urine	polipirol polypyrrole	HPLC-DAD	95	42

Tablica 2 – (nastavak)
Table 2 – (continued)

Priprava uzorka Sample preparation	Analit Analyte	Uzorak Sample	Sorbens Sorbent	Analitička tehnika Analytical technique	Ekstrakcijska učinkovitost/% Extraction efficiency/%	Lit.
IT-SPME	naproksen naproxen	urin urine	polipirol polypyrrole	HPLC-DAD	92 – 99	43
IT-SPME	karbamazepin carbamazepine	urin, plazma urine, plasma	MIP-pyrol@CuO	HPLC-DAD	–	44
MEPS	metadon methadone	suha kap krvi dried blood spot	C18	HPLC-CD	> 90	45
MEPS	okskarbazepin i metabolite oxcarbazepine and metabolite	plazma, slina plasma, saliva	C18	HPLC-DAD	> 87	46
MEPS	okskarbazepin, karbamazepin, fenitoin, alprazolam oxcarbazepine, carbamazepine phenytoin, alprazolam	plazma, urin plasma, urine	C18	GC/MS	70 – 99	47
MEPS	fenobarbital, fenitoin, karbamazepin, primidon, okskarbazepin phenobarbital, phenytoin, carbamazepine, primidone, oxcarbazepine	plazma, urin plasma, urine	C18	HPLC-DAD	89 – 99	48
MEPS	busulfan busulfan	plazma plasma	polistiren polystyrene	LC/MS/MS	60	49
MEPS	ciklofosamid cyclophosphamide	plazma plasma	C2	LC/MS/MS	–	50
MEPS	atorvastatin i metaboliti atorvastatin and metabolites	serum serum	C8	UHPLC–MS/ MS	89 – 116	51
MEPS	omeprazol omeprazole	plazma, slina plasma, saliva	C8	LC/MS/MS	95	52
MEPS	tumorski markeri tumor markers	plazma plasma	porozni grafit porous graphite	LC/MS/MS	–	53
MEPS	tumorski markeri tumor markers	cerebrospinalna tekućina, plazma cerebrospinal fluid, plasma	C18	GC/MS	80 – 90	54
MEPS	pravastatin, pravastatin lakton pravastatin, pravastatin lactone	plazma, urin plasma, urine	C8	UHPLC–MS/ MS	92 – 109	55
MEPS	buprenorfin, metadon, naproksen buprenorphine, methadone, naproxen	plazma plasma	C8	HPLC-CD	86 – 96	56
MEPS	psihoaktivne tvari psychoactive drugs	slina saliva	C18	GC/MS	–	57
MEPS	triciklički antidepresivi, benzodiazepini tricyclic antidepressants, benzodiazepines	krv blood	C8	DI-MS/MS	–	58
<i>in-tip</i> SPME	MK-0533	plazma plasma	polidimetilsiloksan- -divinilbenzen vlakno polydimethylsiloxane- -divinylbenzene fibre	LC-MS/MS	–	60

fena bez primjene kromatografskih sustava. Zanimljiv pristup određivanju diklofenaka u urinu imala je istraživačka grupa *Ahmedi i sur.*⁴² Elektropolimerizirali su pirol smješten na unutarnjoj stijenci kapilare te je dobiveni polipirol služio kao sorbens. Isti pristup primijenjen je i za određivanje naproksena.⁴³ Obje metode su se pokazale iznimno osjetljive budući da su dobivene LOD vrijednosti za ispitane analgetike iznosile $0,1 \mu\text{g l}^{-1}$.

Kao novi inovativni sorbens upotrijebljen je nanomaterijal od bakrenog oksida kojim je presvučena stijenska bakrene cijevi. Nakon toga MIP sorbens polimer s molekulskim otiskom kod kojeg je kao monomer poslužio pirol, a molekula predložak karbamazein. Tako priređen sorbens upotrijebljen je za određivanje karbamazepina u plazmi i urinu pacijenata.⁴⁴

2.2.2. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u igli

Mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbensom smještenim u igli (*in-needle* SPME) također spada u mikroekstrakcije tehnike kod kojih je ekstrakcija analita posredovana protokom. Tehnika se dalje dijeli s obzirom na položaj sorbena u odnosu na iglu (slika 2B). Ako je unutarnja stijenska igle obložena sorbensom, tad se govori o dinamičnoj mikroekstrakciji čvrstom fazom sa sorbensom smještenim u igli (engl. *Solid-Phase Dynamic Microextraction*, SPDE), odnosno ako je sorbens smješten u spremniku igle, tad govorimo o mikroekstrakciji pakiranim sorbensom (engl. *Microextraction by Packed Sorbent*, MEPS). Kod tehnike SPDE analiti se iz uzorka ekstrahiraju na filmu od polidimetilsiloksana i 10 %-nog aktivnog ugljena kojim je obložena unutarnja površina igle od nehrđajućeg čelika. Sorbensi koji se upotrebljavaju kod tehnike MEPS uključuju: modificirani silikagel, polimerne monolitne materijale, MIP i RAM sorbense. Primjenom tehnika SPDE i MEPS uzorkovanje analita provodi se uranjanjem igle u uzorak te njegovim aspiriranjem. Tehnike su prilagođene i za ekstrakciju lako hlapljivih analita iznad tekućih i krutih uzoraka (engl. *headspace*). Tehnika je kompatibilna s različitim analitičkim instrumentima, pri čemu je potrebno istaknuti plinsku i tekućinsku kromatografiju zbog mogućnosti *on-line* povezivanja koraka pripreme i analize uzorka.^{3,7}

U posljednje vrijeme razvijen je velik broj bioanalitičkih metoda koje za pripremu uzoraka primjenjuju tehniku MEPS, a većinom su namijenjene lijekovima koji se već upotrebljavaju u kliničkoj praksi (tablica 2). Tako je tehnikom MEPS unaprijeđeno terapijsko praćenje koncentracije raznovrsnih lijekova, poput opioidnih,⁴⁵ antiepileptičkih⁴⁶ i antikonvulzivnih lijekova,^{47,48} kemoterapeutika,^{49,50} hipolipemika⁵¹ te inhibitora protonske pumpe.⁵²

Nadalje, tehnikom MEPS postignuta je iznimna osjetljivost (LOD vrijednosti i do $0,12 \mu\text{g l}^{-1}$) za tumorske biomarkere, čime je omogućeno ranije postavljanje dijagnoze te posljedno bolji ishodi liječenja pacijenata.^{53,54} Tehnika MEPS vrlo je pogodna za rukovanje s malim volumenima uzoraka krvi (25–50 μl), što ju čini prikladnom tehnikom u pretkliničkim farmakokinetičkim studijama jer doprinosi poštivanju etičkih načela o upotrebi laboratorijskih životinja u biomedicinskim istraživanjima.⁵⁵ Uz to, MEPS pruža nove

mogućnosti za terapijsko praćenje lijekova kod novorođenčadi, male djece i kritično bolesnih pacijenata. Konačno, uporabu je našla i u toksikološkim studijama, kontroli dopinga i zlouporabi lijekova.^{56–58}

2.2.3. Mikroekstrakcija čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete

Kod mikroekstrakcije čvrstom fazom u nastavku za automatske pipete (*in-tip* SPME) od 0,2 do 0,6 μl sorbena smješteno je u vrhu nastavka za automatske pipete najčešće između dva diska (slika 2C). Kao sorbens upotrebljavaju se modificirani silikagel, metakrilatni monoliti i ionsko izmjenjivačke smole. Osim navedenog, kod nekih modifikacija tehnike unutar nastavka za automatske pipete može biti smješteno i vlakno. Bez obzira na to što se ta tehnika ne može povezati *on-line* s naprednim separacijskim tehnikama, njezina velika prednost je mogućnost istodobne pripreme većeg broja uzorka (čak do 96 uzoraka) te mogućnost automatizacije postupka pripreme uzorka.^{55,59} Zbog navedenih prednosti trebalo bi očekivati da je našla široku primjenu u bioanalitičkim istraživanjima, no pregledom literature pronađen je ograničen broj metoda namijenjenih lijekovima u fazi kliničkih ispitivanja (tablica 2).^{59,60}

2.3 Nova inovativna rješenja

Premda tehnike mikroekstrakcije čvrstom fazom nude rješenja za brojna bioanalitička ispitivanja, pojedine istraživačke skupine bave se nalaženjem novih tehnologijskih rješenja. Tako su *Wu i sur.*⁶¹ osmislili tehniku *fiber* SPME *swab* kod koje su vlakna smještena u medicinske pribore za uzimanje brisa. Na taj način objedinjen je korak uzorkovanja i ekstrakcije analita te je neinvazivnim putem moguće uzorkovanje bioloških tekućina poput sline, sluzi te znoja. Štoviše, nakon uzorkovanja vlakno je moguće postaviti u nanoelektrosprej ionozacijsku kapilaru za brzu identifikaciju lijekova i njihovih metabolita masenom spektrometrijom.⁶² *Manousi i sur.*⁶³ postavili su sol-gel sorbens u kapsulu te su ga primijenili za ekstrakciju ibuprofena iz urina. Osim što je sorbens moguće višestruko upotrijebiti, postignuta je izvrsna osjetljivost metode (dobivena LOD vrijednost iznosila je $14 \mu\text{g l}^{-1}$). Tehnologija *lab-on-valve* te sustav injektiranja kuglica sorbena pokazala se prikladnim rješenjem za implementaciju automatizirane mikroekstrakcije čvrstom fazom. Tehnika je primijenjena za ekstrakciju traneksamske kiseline iz urina⁶⁴ te kotinina, metabolita nikotina, u slini.⁶⁵

3. Zaključak

Provedeno istraživanje upućuje na danas sve važniju ulogu mikroekstrakcije čvrstom fazom u bioanalitici, i to ponajprije u personaliziranoj brizi za zdravlje, farmakokinetičkim i metabolomičkim ispitivanjima, ali i ranog dijagnostički bolesti. Te napredne tehnike pripreme uzoraka nude rješenja za ono što je danas imperativ u kliničkim laboratorijima, poput neinvazivnog uzorkovanja malih volumena

bioloških uzoraka, automatizacije postupaka pripreme i analize uzorka, ekološke i ekonomske isplativosti analitičkih postupaka.

Najnovija istraživanja upućuju na činjenicu da će se tehnika dalje razvijati. Velik potencijal tehnike leži u razvoju novih inovativnih, visoko selektivnih i stabilnih sorbena, ali treba istaknuti i najnovija tehnologijska rješenja koja čekaju širu komercijalnu upotrebu.

ZAHVALA

Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost (projekt: Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva, HRZZ-UIP-2017-05-3949).

Popis kratica

List of abbreviations

- BioSPME – modifikacija mikroekstrakcije čvrstom fazom sa sorbentom u obliku vlakna prilagođena za *in vivo* uzorkovanje
– Fiber Solid-Phase Microextraction adjusted for *in vivo* sampling
- CE/MS – vezani sustav kapilarne elektroforeze i masene spektrometrije
– Capillary Electrophoresis Mass Spectrometry
- DI-SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom s direktnim uranjanjem
– Direct Immersion – Solid-Phase Microextraction
- dSPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom u obliku praška
– *dispersive* Solid-Phase Microextraction
- fiber* SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom u obliku vlakna
– Fiber Solid-Phase Microextraction
- GC/MS – vezani sustav plinske kromatografije i masene spektrometrije
– Gas Chromatography Mass Spectrometry
- HS-SBSE – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim na magnetu iznad tekućeg odnosno krutog uzorka izloženog povišenoj temperaturi
– Headspace-Stir-Bar Sorptive Microextraction
- HS-SPME – indirektna mikroekstrakcija čvrstom fazom
– Headspace – Solid-Phase Microextraction
- in-needle* SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim u igli
– *in-needle* Solid-Phase Microextraction
- in-tip* SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim u nastavku za automatske pipete
– *in-tip* Solid-Phase Microextraction
- IT-SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim u koloni
– *in-tube* Solid-Phase Microextraction
- LC/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i masene spektrometrije
– Liquid Chromatography Mass Spectrometry

- LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće
– Liquid-Liquid Extraction
- LOD – granica dokazivanja
– Limit of Detection
- MEPS – mikroekstrakcija čvrstom fazom s pakiranim sorbentom
– Microextraction by Packed Sorbent
- MIP – polimeri s molekularnim otiskom
– Molecularly Imprinted Polymers
- ^mSBSE – istovremena ili uzastopna primjena nekoliko različitih sorbent smještenih na magnetu
– Multi-Stir Bar Sorptive Microextraction
- RAM – materijali ograničenog pristupa
– Restricted Access Material
- RAMIP – sorbent koji kombinira mehanizme polimera s molekularnim otiskom i materijala ograničenog pristupa
– Restricted Access Molecularly Imprinted Polymers
- SA-SBSE – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim na magnetu koji u dodiru s otapalom bubri
– Solvent-Assisted Stir Bar Sorptive Microextraction
- SBSE – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim na magnetu
– Stir-Bar Sorptive Microextraction
- SFC/MS – vezani sustav superkrične kromatografije i masene spektrometrije
– Supercritical Chromatography Mass Spectrometry
- SPDE – dinamična mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom smještenim u igli
– Solid-Phase Dynamic Microextraction
- SPE – ekstrakcija čvrstom fazom
– Solid-Phase Extraction
- SPME – mikroekstrakcija čvrstom fazom
– Solid-Phase Microextraction
- TFME – mikroekstrakcija čvrstom fazom sa sorbentom u obliku tankog filma
– Thin Film Solid-Phase Microextraction

Literatura

References

1. S. Pandey, P. Pandey, G. Tiwari, R. Tiwari, Bioanalysis in drug discovery and development, *Pharm. Methods* **1** (2010) 14–24, doi: <https://doi.org/10.4103/2229-4708.72223>.
2. M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M. M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: an overview, *J. Chromatogr. A* **1616** (2020) 460790, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460790>.
3. S. Dugheri, N. Mucci, A. Bonari, G. Marrubini, G. Cappelli, D. Ubiali, M. Campagna, M. Montalti, G. Arcangeli, Solid phase microextraction techniques used for gas chromatography: a review, *Acta Chromatogr.* **32** (2020) 1–9, doi: <https://doi.org/10.1556/1326.2018.00579>.
4. A. Kabir, M. Locatelli, H. I. Ulusoy, Recent trends in microextraction techniques employed in analytical and bioanalytical sample preparation, *Separations* **4** (2017) 4–36, doi: <https://doi.org/10.3390/separations4040036>.

5. A. Mornar, B. Nigović, D. Amidžić Klarić, M.-L. Jeličić, E. Brusač, Ekstrakcija čvrstom fazom – primjena u bioanalitici, *Farm. Glas.* **76** (2020) 353–394.
6. J. A. Ocaña-González, R. Fernández-Torres, M. Á. Bello-López, M. Ramos-Payán, New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review, *Anal. Chim. Acta* **905** (2016) 8–23, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.10.041>.
7. H. Katoka, Current developments and future trends in solid-phase microextraction techniques for pharmaceutical and biomedical analyses, *Anal. Sci.* **27** (2011) 893–905, doi: <https://doi.org/10.2116/analsci.27.907>.
8. B. Hashemi, P. Zohrabi, M. Shamsipur, Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples, *Talanta* **187** (2018) 337–347, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053>.
9. S. Armenta, F. A. Esteve-Turrillas, S. Garrigues, M. de la Guardia, Smart materials for sample preparation in bioanalysis: a green overview, *Sustain. Chem. Pharm.* **21** (2021) 100411, doi: <https://doi.org/10.1016/j.scp.2021.100411>.
10. M. Szultka, R. Krzeminski, M. Jackowski, B. Buszewski, Simultaneous determination of selected chemotherapeutics in human whole blood by molecularly imprinted polymers coated solid phase microextraction fibers and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* **940** (2013) 66–76, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.009>.
11. M. Szultka-Młyńska, D. Janiszewska, B. Buszewski, Molecularly imprinted polymers as solid-phase microextraction fibers for the isolation of selected antibiotics from human plasma, *Materials* **14** (2021) 4886, doi: <https://doi.org/10.3390/ma14174886>.
12. L. C. de Carvalho Abrão, E. Costa Figueiredo, A new restricted access molecularly imprinted fiber for direct solid phase microextraction of benzodiazepines from plasma samples, *Analyst* **144** (2019) 4320–4330, doi: <https://doi.org/10.1039/c9an00444k>.
13. B. Bojko, N. Reyes-Garcés, V. Bessonneau, K. Goryński, F. Mousavi, E. A. Souza Silva, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction in metabolomics, *Trends Anal. Chem.* **61** (2014) 168–180, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.005>.
14. B. Bojko, M. Wąsowicz, J. Pawliszyn, Metabolic profiling of plasma from cardiac surgical patients concurrently administered with tranexamic acid: DI-SPME-LC-MS analysis, *J. Pharm. Anal.* **4** (2014) 6–13, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2013.03.002>.
15. V. Bessonneau, B. Bojko, J. Pawliszyn, Analysis of human saliva metabolome by direct immersion solid-phase microextraction LC and benchtop orbitrap MS, *Bioanalysis* **5** (2013) 783–792, doi: <https://doi.org/10.4155/bio.13.35>.
16. C. L. Silva, M. Passos, J. S. Câmara, Solid phase microextraction, mass spectrometry and metabolomic approaches for detection of potential urinary cancer biomarkers—a powerful strategy for breast cancer diagnosis, *Talanta* **89** (2012) 360–368, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.041>.
17. C. L. Silva, M. Passos, J. S. Câmara, Investigation of urinary volatile organic metabolites as potential cancer biomarkers by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography-mass spectrometry, *Br. J. Cancer.* **105** (2011) 1894–1904, doi: <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.437>.
18. C. Vejar-Vivar, M. T. García-Valverde, C. Mardones, R. Lucena, S. Cárdenas, Polydopamine coated hypodermic needles as a microextraction device for the determination of tricyclic antidepressants in oral fluid by direct infusion MS/MS, *RSC Adv.* **11** (2021) 22683–22690, doi: <https://doi.org/10.1039/d1ra02721b>.
19. B. Bojko, N. Looby, M. Olkowicz, A. Roszkowska, B. Kupcewicz, P. Reck dos Santos, K. Ramadan, S. Keshavjee, T. K. Waddell, G. Gómez-Ríos, M. Tascon, K. Goryński, M. Cypel, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction chemical biopsy tool for monitoring of doxorubicin residue during in vivo lung chemo-perfusion, *J. Pharm. Anal.* **11** (2021) 37–47, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.08.011>.
20. V. D. Schaefer, L. de Lima Feltraco Lizot, R. Z. Hahn, A. Schneider, M. V. Antunes, R. Linden, Simple determination of valproic acid serum concentrations using BioSPME followed by gas chromatography-mass spectrometric analysis, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life. Sci.* **15** (2021) 1167, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122574>.
21. E. Baltussen, S. Pat, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles, *J. Microcolumn Sep.* **11** (1999) 737–747, doi: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-667X\(1999\)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4).
22. M. Szultka, P. Pomastowski, V. Railean-Plugaru, B. Buszewski, Microextraction sample preparation techniques in biomedical analysis, *J. Sep. Sci.* **37** (2014) 3094–3105, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201400621>.
23. X. Huang, D. Yuan, B. Huang, Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection, *Talanta* **75** (2008) 72–77, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.052>.
24. J.-P. Lambert., W. M. Mullett, E. Kwong, D. Lubda, Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids, *J. Chromatogr. A* **1075** (2005) 43–49, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.119>.
25. L. P. Melo, A. M. Nogueira, F. M. Lancas, M. E. C. Queiroz, Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples, *Anal. Chim. Acta* **63** (2009) 57–64, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.11.042>.
26. R. Jiang, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction, *Trends Anal. Chem.* **39** (2012) 245–253, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.005>.
27. V. Bessonneau, E. Boyaci, M. Maciazek-Jurczyk, J. Pawliszyn, In vivo solid phase microextraction sampling of human saliva for non-invasive and on-site monitoring, *Anal. Chim. Acta* **856** (2015) 35–45, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.11.029>.
28. S. Riazanskaia, G. Blackburn, M. Harker, D. Taylor, C. L. P. Thomas, The analytical utility of thermally desorbed polydimethylsilicone membranes for in-vivo sampling of volatile organic compounds in and on human skin, *Analyst* **133** (2008) 1020–1027, doi: <https://doi.org/10.1039/b802515k>.
29. A. N. Thomas, S. Riazanskaia, W. Cheung, Y. Xu, R. Goodacre, C. L. P. Thomas, M. S. Baguneid, A. Bayat, Novel noninvasive identification of biomarkers by analytical profiling of chronic wounds using volatile organic compounds: novel noninvasive analysis of chronic wounds, *Wound Repair Regen.* **18** (2010) 391–400, doi: <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2010.00592.x>.
30. B. Sefaty, M. Masrournia, Z. Es'haghi, M. Reza Bozorgmehr, Determination of tramadol and fluoxetine in biological and water samples by magnetic dispersive solid-phase microextraction (MDSPE) with gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), *Anal. Lett.* **54** (2021) 884–902, doi: <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1786695>.
31. A. Speltini, F. Merlo, F. Maraschi, G. Marrubini, A. Faravelli, A. Profumo, Magnetic micro-solid-phase extraction using a

- novel carbon-based composite coupled with HPLC–MS/MS for steroid multiclass determination in human plasma, *Molecules* **26** (2021) 2061, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26072061>.
32. N. Manousi, P. D. Tzanavaras, C. K. Zacharis, Bioanalytical HPLC Applications of in-tube solid phase microextraction: a two-decade overview, *Molecules* **25** (2020) 2096, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25092096>.
33. M. Fernández-Amado, M. C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: a scoping review, *Anal. Chim. Acta* **906** (2016) 41–57, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.007>.
34. R. Yasuhara, K. Ehara, K. Saito, H. Kataoka, Automated analysis of salivary stress-related steroid hormones by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* **4** (2012) 3625–3630, doi: <https://doi.org/10.1039/C2AY25752A>.
35. H. Kataoka, K. Ehara, R. Yasuhara, K. Saito, Simultaneous determination of testosterone, cortisol, and dehydroepiandrosterone in saliva by stable isotope dilution on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **405** (2013) 331–340, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6479-4>.
36. K. Saito, K. Yagi, A. Ishizaki, H. Kataoka, Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **52** (2010) 727–733, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.02.027>.
37. J. A. Caris, B. J. G. Silva, E. C. D. Moisés, V. L. Lanchote, M. E. C. Queiroz, Automated analysis of lidocaine and its metabolite in plasma by in-tube solid-phase microextraction coupled with LC-UV for pharmacokinetic study: sample preparation, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 734–741, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201100872>.
38. L. P. Melo, R. H. C. Queiroz, M. E. C. Queiroz, Automated determination of rifampicin in plasma samples by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **879** (2011) 2454–2458, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.06.041>.
39. H. Kataoka, S. Kaji, M. Moai, Risk assessment of passive smoking based on analysis of hair nicotine and cotinine as exposure biomarkers by in-tube solid-phase microextraction coupled on-line to LC-MS/MS, *Molecules* **26** (2021) 7356, doi: <https://doi.org/10.3390/molecules26237356>.
40. Q.-W. Yu, X. Wang, Q. Ma, B.-F. Yuan, H.-B. He, Y.-Q. Feng, Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry based on a poly(4-vinylpyridine-co-ethylene dimethacrylate) monolith, *Anal. Methods* **4** (2012) 1538–1545, doi: <https://doi.org/10.1039/C1AY05412K>.
41. W. Hu, W. Zhou, C. Wang, Z. Liu, Z. Chen, Rapid analysis of biological samples using monolithic polymer-based in-tube solid-phase microextraction with direct mass spectrometry, *Appl. Bio Mater.* **4** (2021) 6236–6243, doi: <https://doi.org/10.1021/acsabm.1c00551>.
42. S. H. Ahmadi, A. Manbohi, K. T. Heydar, Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction, *Anal. Chim. Acta* **853** (2015) 335–341, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.10.040>.
43. S. H. Ahmadi, A. Manbohi, K. T. Heydar, Electrochemically controlled in-tube solid phase microextraction of naproxen from urine samples using an experimental design, *Analyst* **140** (2015) 497–505, doi: <https://doi.org/10.1039/c4an01664e>.
44. H. Kefayati, Y. Yamini, M. Shamsayei, S. Abdi, Molecularly imprinted polypyrrole@CuO nanocomposite as an in-tube solid-phase microextraction coating for selective extraction of carbamazepine from biological samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **204** (2021) 114256, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114256>.
45. M. A. Saracino, C. Marcheselli, L. Somaini, M. C. Pieri, G. Gerra, A. Ferranti, M. A. Raggi, A novel test using dried blood spots for the chromatographic assay of methadone, *Anal. Bioanal. Chem.* **404** (2012) 503–511, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6157-6>.
46. M. A. Saracino, K. Tallarico, M. A. Raggi, Liquid chromatographic analysis of oxcarbazepine and its metabolites in plasma and saliva after a novel microextraction by packed sorbent procedure, *Anal. Chim. Acta* **661** (2010) 222–228, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.12.030>.
47. S. Rani, A. K. Malik, A novel microextraction by packed sorbent-gas chromatography procedure for the simultaneous analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine: sample preparation, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 2970–2977, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201200439>.
48. S. Rani, A. K. Malik, B. Singh, Novel micro-extraction by packed sorbent procedure for the liquid chromatographic analysis of antiepileptic drugs in human plasma and urine, *J. Sep. Sci.* **35** (2012) 359–366, doi: <https://doi.org/10.1002/jssc.201100789>.
49. M. Abdel-Rehim, Z. Hassan, P. Skanse, M. Hassan, Simultaneous determination of busulphan in plasma samples by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry utilizing microextraction in packed syringe (MEPS) as on-line sample preparation method, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **30** (2007) 3029–3041, doi: <https://doi.org/10.1080/10826070701632337>.
50. R. Said, Z. Hassan, M. Hassan, M. Abdel-Rehim, Rapid and sensitive method for determination of cyclophosphamide in patients plasma samples utilizing microextraction by packed sorbent online with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (MEPS-LC-MS/MS), *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31** (2008) 683–694, doi: <https://doi.org/10.1080/10826070701853867>.
51. H. Vlčková, D. Solichová, M. Bláha, P. Solich, L. Nováková, Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples-critical evaluation, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **55** (2011) 301–308, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.01.025>.
52. H. Ahmed, A. A. Wahbi, H. Elmongy, A. Amini, H. Koyi, E. Branden, M. Abdel-Rehim, Determination and pharmacokinetics of omeprazole enantiomers in human plasma and oral fluid utilizing microextraction by packed sorbent and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Int. J. Anal. Chem.* **2021** (2021) 8845139, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/8845139>.
53. X. Xiong, Y. Zhang, R. Zhao, Quantitative measurement of plasma free metanephrines by a simple and cost-effective microextraction packed sorbent with porous graphitic carbon and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Anal. Methods Chem.* **2021** (2021) 8821276, doi: <https://doi.org/10.1155/2021/8821276>.
54. A. K. Pautova, Z. B. Khesina, T. N. Litvinova, A. I. Revelsky, N. V. Beloborodova, Metabolic profiling of aromatic compounds in cerebrospinal fluid of neurosurgical patients using microextraction by packed sorbent and liquid-liquid extraction with gas chromatography-mass spectrometry analysis,

- Biomed. Chromatogr. **35** (2021) e4969, doi: <https://doi.org/10.1002/bmc.4969>.
55. H. Vlčková, M. Rabatinová, A. Mikšová, G. Kolouchová, S. Mičuda, P. Solich, L. Nováková, Determination of pravastatin and pravastatin lactone in rat plasma and urine using UHPLC-MS/MS and microextraction by packed sorbent, *Talanta* **90** (2012) 22–29, doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.043>.
56. L. Somaini, M. A. Saracino, C. Marcheselli, S. Zanchini, G. Gerra, M. A. Raggi, Combined liquid chromatography-coulometric detection and microextraction by packed sorbent for the plasma analysis of long acting opioids in heroin addicted patients, *Anal. Chim. Acta* **702** (2011) 280–287, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.032>.
57. A. Sorribes-Soriano, J. Verdeguer, A. Pastor, S. Armenta, F. A. Esteve-Turrillas, Determination of third-generation synthetic cannabinoids in oral fluids, *J. Anal. Toxicol.* **45** (4) (2021) 331–336, doi: <https://doi.org/10.1093/jat/bkaa091>.
58. C. Vejar-Vivar, L. Bustamante, R. Lucena, C. Ortega, M. Valenzuela, C. Mardones, Direct coupling of MEPS to ESI-QqTOF-MS for the simultaneous analysis of tricyclic antidepressants and benzodiazepines in postmortem blood, *Microchem. J.* **171** (2021) 106797, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106797>.
59. D. Turoňová, L. Kujovská Krčmová, F. Švec, Application of microextraction in pipette tips in clinical and forensic toxicology, *Trends Anal. Chem.* **143** (2021) 116404, doi: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116404>.
60. W. Xie, W. M. Mullett, C. M. Miller-Stein, J. Pawliszyn, Automation of in-tip solid-phase microextraction in 96-well format for the determination of a model drug compound in human plasma by liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **877** (2009) 415–420, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.12.036>.
61. L. Wu, Z.-C. Yuan, Z.-M. Li, Z. Huang, B. Hu, In vivo solid-phase microextraction swab sampling of environmental pollutants and drugs in human body for nano-electrospray ionization mass spectrometry analysis, *Anal. Chim. Acta* **1124** (2020) 71–77, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.022>.
62. L. Wu, Z.-C. Yuan, B.-C. Yang, Z. Huang, B. Hu, In vivo solid-phase microextraction swab-mass spectrometry for multidimensional analysis of human saliva, *Anal. Chim. Acta* **1164** (2021) 338510, doi: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338510>.
63. N. Manousi, A. Kabir, K. G. Furton, V. F. Samanidou, C. K. Zacharis, Exploiting the capsule phase microextraction features in bioanalysis: extraction of ibuprofen from urine samples, *Microchem. J.* **172** (2022) 106934, doi: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106934>.
64. S. R. Fernandes, L. Barreiros, P. Sá, M. Miró, M. A. Segundo, Automatic and renewable micro-solid-phase extraction based on bead injection lab-on-valve system for determination of tranexamic acid in urine by UHPLC coupled with tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* **414** (2022) 649–659, doi: <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03606-y>.
65. A. N. Ramdzan, L. Barreiros, M. I. G. S. Almeida, S. D. Kolev, M. A. Segundo, Determination of salivary cotinine through solid phase extraction using a bead-injection lab-on-valve approach hyphenated to hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* **1429** (2016) 284–291, doi: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.051>.

SUMMARY

Solid Phase Microextraction – An Innovative Approach to Bioanalytical Research

Ana Mornar,^{a*} Iva Marinac-Andić,^{a,b} Daniela Amidžić Klarić,^a and Jelena Kovačić^a

In last three decades, the solid-phase microextraction technology has brought significant progress in bioanalytical research due to the versatility of this fast and solvent-free approach to biological sample preparation. It has been widely used in combination with various analytical instrumentation, even if most of the work has been done by coupling the extraction technique with liquid or gas chromatography. This review focuses on the new developments and advances in solid-phase microextraction-based techniques. Furthermore, some interesting, new innovations that fail to go beyond academic research are also reported.

Keywords

Bioanalysis, sample preparation, solid-phase microextraction, therapeutic drug monitoring

^a Department of Pharmaceutical Analysis,
University of Zagreb, Faculty of Pharmacy
and Biochemistry, A. Kovačića 1,
10 000 Zagreb, Croatia

^b Pliva Croatia, Prilaz baruna Filipovića 25,
10 000 Zagreb, Croatia

Review
Received January 20, 2022
Accepted March 5, 2022