

SEPARAČNÉ METÓDY PRI MONITOROVANÍ CHIRÁLNYCH LIEČIV S VYUŽITÍM PRIAMEHO NÁSTREKU BIOLOGICKEJ VZORKY

CSILLA MIŠEANOVÁ a JANA ORAVCOVÁ

Ústav preventívnej a klinickej medicíny, Limbová 14,
833 01 Bratislava, Slovenská republika

e-mail: oravcova@enigma.upkm.sanet.sk

e-mail: mislan@enigma.upkm.sanet.sk

Došlo dňa 23.VII.1997

Obsah

1. Úvod
2. Ciele bioanalytického monitorovania chirálnych liečiv
 - 2.1. Špecifické farmakokinetické aspekty:
monitorovanie „voľného liečiva“/enantioméru
 - 2.1.1. Frontálna analýza (HPFA)
 - 2.1.2. Mikrodialýza
3. Nové trendy v technikách predúpravy biologickej vzorky
 - 3.1. Konvenčné vs. alternatívne metódy predúpravy v podmienkach HPLC
 - 3.2. Kapilárna elektroforéza (CE)
4. Priamy nástrek biologickeho materiálu
 - 4.1. Stacionárne fázy typu RAM
 - 4.2. HPLC - integrovaná predúprava biologickej vzorky
5. Validácia stereoselektívnych bioanalytických metód s priamym nástrekom biologickeho materiálu
6. Záver

1. Úvod

Vzhľadom na skutočnosť, že približne 40 % dnes používaných liečiv je chirálnych, sústredila sa v ostatných rokoch značná pozornosť na stereochemiu liečiv a jej dopad v klinickej farmakokinetike i farmakoterapii¹⁻⁴. Selektivita účinku chirálneho liečiva je okrem iných fyzikálno-chemických vlastností rozhodujúcou mierou daná i jeho priestorovou komplementaritou so špecifickými receptormi, enzýmami, iónovými kanálmi a inými transportnými systémami fungujúcimi ako tzv. chirálne selektory⁵⁻⁸; stereo-

izoméry je nutné považovať za chemicky rozdielne entity líšiace sa často nielen farmakologickým účinkom ale i farmakokinetickým profilom. Rozdiely vo farmakokinetických parametroch jednotlivých enantiomérov sú determinované tým, že pôvodný ekvimolárny pomer enantiomérov v spravidla terapeuticky podanom racemáte sa môže s časom v plazme, moči, resp. v iných biologických matriciach výraznejšie meniť. Paralelne s vývojom dostatočne citlivých stereošpecifických analytických metód bolo v ostatnom období uskutočnené veľké množstvo experimentálnych i klinických štúdií orientovaných na rôzne aspekty chiralít vo farmakokinetike - výrazný stupeň stereoselektivity bol opísaný okrem vazby na proteíny (tkanivové alebo plazmatické)⁹ i pre spôsob a rýchlosť metabolizmu individuálnych enantiomérov chirálnych liečiv^{3,10,11}. Aj keď základné princípy tzv. priamej i nepriamej chirálnej separácie liečiv vrátane aspektov možnej chirálnej interkonverzie boli v uvedenom časopise nedávno prehľadne zhrnuté a diskutované¹², zavedenie nových HPLC alebo CE techník s alternatívnou, resp. integrovanou predúpravou biologickej matrice posunulo horizont ambícií bioanalytikov v tomto smere výrazne dopredu. Cieľom predloženého prehľadového referátu je predstaviť novšie metodické a inštrumentálne alternatívy a trendy pri monitorovaní chirálnych liečiv v roznych biologických vzorkách.

2. Ciele bioanalytického monitorovania chirálnych liečiv

Štúdium distribúcie, metabolizmu i eliminácie chirálneho liečiva v rôznych zložkách organizmu je okrem iného nevyhnutné i z hľadiska správnej interpretácie výsledkov farmakokinetických a toxikokinetických štúdií⁴. Tabuľka I uvádza prehľad stereoselektívnych stanovení liečiv v „konvenčných“ biologických vzorkách. Pozornosť sa v ostatnom období orientuje často i na analýzu chirálnych liečiv v tzv. „nekonvenčných“ biologických tekutinách akými sú sliny, žlč, plodová voda, mozgomiešny mok, materské mlieko, synoviálna tekutina, tkanivá, a pod.¹³ Presné stanovenie koncentrácie analytu/enantioméru v týchto matriciach umožňuje okrem zohľadnenia fenoménov kumulácie

Tabulka I

Príklady stereoselektívnych stanovení chirálnych liečiv v rôznych maticiach

Liečivo/metabolit ^a	Matrica	Anal.metóda/ detekcia ^b	Spôsob predúpravy	Cit.
(<i>RS</i>)-Zopiklon	plazma	HPLC/FD	LLE	117
(<i>RS</i>)-Zopiklon/N-De, N-Ox	moč, sliny	CE/UV-LIF	LLE	18
(<i>RS</i>)-Salbutamol	plazma, moč	HPLC/FD	SPE	118
(<i>RS</i>)-Felodipin	plazma	GC/MS	LLE	119
(<i>RS</i>)-Sotalol	plazma, moč	HPLC/UV	SPE	120
	plazma, moč	HPLC/FD	LLE	121
	plazma, moč, žlč	HPLC	priamy nástrek	122
(<i>RS</i>)-Nimodipin	plazma	HPLC-MS-MS	LLE	123
(<i>RS</i>)-Pindolol	sérum, moč	HPLC/FD	SPE	124
(<i>RS</i>)-Metoprolol	plazma	HPLC/FD	LLE	125
(<i>RS</i>)-Ketoprofen	plazma, moč	HPLC/UV	LLE	126
	žlč, perfuzáty pečene	HPLC/UV	priamy nástrek	127
(<i>RS</i>)-Salsolinol/N-metyl salsolinol	mozgové tkanivo	HPLC/ECD	priamy nástrek	128
(±)-Metamfetamin/amfetamin,	moč	HPLC+HPLC/MS	SPE	129
<i>p</i> -OH MFA				
(<i>RS</i>)-Tiaprofenová kyselina	plazma	HPLC/UV	LLE	38
(<i>RS</i>)-Verapamil/norverapamil	plazma	CE/UV	LLE	64
	perfuzáty pečene	HPLC/UV	LLE	130
(<i>RS</i>)-Oxprenolol	moč	CZE/UV	LLE	65
(<i>RS</i>)-Metadon	sérum	HPLC/UV	SPE	51
(<i>RS</i>)-Warfarin	plazma	CZE/UV	LLE	62
(<i>RS</i>)-Etodolak	plazma, moč, žlč	HPLC	LLE	22
(<i>RS</i>)-Propranolol	plazma	HPLC/FD	LLE	131
	sérum	HPLC/FD	SPE	48
	plazma, krv,	HPLC/FD	priamy nástrek	95
	homogenáty tkanív			
(<i>RS</i>)-Bupivakain, (<i>RS</i>)-verapamil,	sérum	CE/UV	LLE	63
(<i>RS</i>)-mepivakain, (<i>RS</i>)-karvedilol,				
(<i>RS</i>)-pindolol, (±)-fluoxetin				

^a MFA - metamfetamin; (N-De) - N-desmetylzopiklon; (N-Ox) - zopiklon N-oxid; (*p*-OH MFA) - *p*-hydroxymetamfetamin; ^b FD - fluorescenčná detekcia; ECD - elektrochemická detekcia; LIF - laser induced fluorescence

alebo recirkulácie v jednotlivých zložkách aj hodnotenie fetálnej a perinatálnej expozície organizmu, resp. možných genotoxických vplyvov (napr. pri analýze materského mlieka alebo amniotickej tekutiny). Štúdie zamerané na stereoselektívnu analýzu liečiv v slinách (reprezentujúcich z hľadiska interpretácie koncentráciu liečiva v tzv. intersticiálnom priestore¹⁴⁻¹⁶) preukázali, že kým transport enantiomérov propranololu nevykazoval výraznejšie rozdiely¹⁷,

v prípade (±)-zopiklonu bol naopak aktívny a stereošpecifický¹⁸. Pre exaktné stanovenie vzťahu dávky a účinku, bol u nesteroidných antireumatík (enantiomérov ibuprofenu a etodolaku) hodnotený ich prienik do synoviálnej tekutiny¹⁹⁻²¹. V niektorých prípadoch (etodolak²²) sa pre posúdenie ich možnej stereoselektívnej biliárnej exkrécie záujem sústredil i na analýzu enantiomérov liečiva a jeho metabolitov v žlči.

2.1. Špecifické farmakokinetické aspekty: monitorovanie „voľného“ liečiva/enantioméru

2.1.1. Frontálna analýza (HPFA)

Okrem bežne uvažovanej celkovej koncentrácie analytu je predmetom farmakokinetických štúdií i hodnotenie tzv. voľnej koncentrácie liečiva (c_f), reprezentujúcej tzv. farmakologicky účinnú frakciu²³. Metóda frontálnej analýzy s využitím stacionárnych fáz typu „restricted access materials“ (RAM) (kapitola 4) v on-line prepojení s chirálnou HPLC, prípadne CE analýzou umožnila priamu analýzu voľnej frakcie enantiomérov warfarínu²⁴, ketoprofenu²⁵, fenoprofenu²⁶, nilvadipínu²⁷ a verapamilu²⁸. Jej výhoda pre lipofilné látky spočíva v eliminácii nežiadúcej adsorpcie analytu (ako je tomu v prípade rovnovážnej dialýzy alebo ultrafiltrácie) a v možnosti priamej stereoselektívnej analýzy c_f aj v komplexnej matrici akou je sérum²⁴. Nevýhodou HPFA môžu byť vysoké detekčné limity pre niektoré látky, obmedzujúce stanovenie c_f pri terapeuticky relevantných koncentráciách. Frontálna analýza v podmienkach CE vyžaduje nástrek len niekoľko desiatok nanolitrov²⁹ na rozdiel od HPLC, kde je objem vzorky zvlášť pre hydrofilné liečivá >100 μ l.

2.1.2. Mikrodialýza

Kým HPFA je schopná stanoviť c_f v podmienkach *in vitro*, resp. *ex vivo*, pre interpretáciu situácie v podmienkach *in vivo* bola zavedená alternatívna mikroperfúzna odberová technika, mikrodialýza, umožňujúca kontinuálne monitorovanie c_f v krvi i tkanivách experimentálnych zvierat³⁰. Z analytického hľadiska je mikrodialyzát (podobne ako ultrafiltrát) matrica zbavená interferujúcich endogénnych látok a v zásade je vhodná i pre priamy nástrek v podmienkach (kapilárnej) HPLC ako aj CE^{31,32}. Z praktického hľadiska je problematickým predovšetkým malý objem získanej vzorky (rýchlosť perfúzie býva spravidla menšia ako 1-2 μ l.min⁻¹), nízka výťažnosť (20-30 %) niektorých mikrodialyzačných odberových kanýl a samozrejme i objektívne nízka koncentrácia analytu v prípade liečiv pevne viazaných na proteiny. Pre stereoselektívne monitorovanie liečiv s využitím priamych metód chirálnej separácie je preto výhodné zohľadniť niektorú z alternatív inštrumentálneho zapojenia opísanom v kapitole 4.2.1. (cit.^{33,34}). Vo všeobecnosti je mikrodialýzu možné využiť aj pre odber, resp. stanovenie c_f v podmienkach *in vitro*^{35,36}.

3. Nové trendy v technikách predúpravy biologickej vzorky

Cieľ analytickej (konvenčnej alebo alternatívnej) predúpravy vzorky biologickej matrice spočíva³⁷:

1) v separovaní analytov od bielkovín (najčastejšie precipitáciou, resp. denaturáciou bielkovín, pričom dochádza k uvoľneniu na proteiny viazaného podielu liečiva a stanovuje sa tzv. celková koncentrácia analytu), 2) v odstránení interferujúcich látok, ktoré by mohli negatívne ovplyvniť retenciu analytu alebo správnosť stanovenia a 3) v zakoncentrovaní analytu pre zvýšenie citlivosti stanovenia.

3.1. Konvenčne vs. alternatívne metódy predúpravy v podmienkach HPLC

Konvenčne extrakčné metódy sú orientované na precipitáciu bielkovín, prípadnú úpravu pH a následnú extrakciu analytu do vhodnej organickej fázy („liquid-liquid extraction“, LLE). Vyžadujú spravidla veľký objem vzorky (≥ 1 ml), prítomnosť interného štandardu; ich nevýhodou je i možná svetelná³⁸, resp. tepelná expozícia a degradácia analytu, adsorpcia analytu na sklo, vysoká spotreba organických rozpúšťadiel, relatívne nízka extrakčná účinnosť a v niektorých prípadoch i nedostatočná reprodukovateľnosť^{37,39}. Dôvodom pre dlhodobé používanie metód LLE je jednoduchosť ich praktického prevedenia (pri vhodnom výbere polarita organických rozpúšťadiel, pH a pod.) a z tohto dôvodu sú často používané aj v prípade chirálnych liečiv (tabuľka I). Alternatívou k LLE je „extrakcia tuhou fázou“ („solid-phase extraction“, SPE), ktorej výhoda spočíva v nižšej spotrebe organických rozpúšťadiel, v časovej optimalizácii a predovšetkým v možnosti úplnej automatizácie. Aplikácia bežne používaných SPE sorbentov na báze silikagélu (napr. C₄, C₈, C₁₈) je limitovaná ich nízkou stabilitou pri vyšších hodnotách pH, ako aj adsorpciou iónových látok na povrchu vzhľadom k prítomnosti voľných silanolových skupín⁴⁰. Vysokú chemickú a fyzikálnu stabilitu poskytujú porózne uhlíkové sorbenty^{41,42}, ktoré sú stabilné v kyslom i zásaditom prostredí, t.j. môžu byť použité v širokom rozmedzí pH a sú využívané chromatograficky predovšetkým ako reverzne-fázové alebo normálne-fázové sorbenty. Sú charakterizované homogénnym špecifickým povrchom s pravidelnou štruktúrou a plochou okolo 150–200 m²g⁻¹, pričom ich povrch je hydrofóbnejší a ľahšie „kontaminovateľný“ v porovnaní so silikagélovými sorbentmi. Silné adsorpčné vlastnosti môžu spôsobovať

problémy pri elúcii vysoko retardovaných hydrofóbných látok⁴³. Jedným z možných spôsobov zníženia nadmernej adsorpcie analytov je ich technologická príprava zo sféric-kých častíc celulózy neobsahujúcich zvyšky silikagélu ani voľné silanolové skupiny na povrchu⁴⁴. Porózne grafiti-zované uhlíkové sorbenty boli aplikované pre SPE kon-jugátov steroidných hormónov z moču, séra a plodovej vody⁴⁵; estriolu zo séra alebo plazmy⁴⁶; tricyklických an-tidepressív zo séra⁴⁷. Okrem bežne používaných silikagélo-vých SPE sorbentov (napr. C₆, C₁₈) bol opísaný aj typ vysokoporóznych polystyrénových sorbentov (Styrosorb), ktorý má vyššiu sorpčnú kapacitu, je vhodný pre extrakciu nepolárnych látok z vodných i organických médií a prak-ticky bol použitý napríklad pri stereoselektívnom stanovení (RS)-propranololu v sére⁴⁸. Mikroporózny hydrofóbný cha-rakter polymérneho Styrosorbu (priemer pórov < 2 nm), ktorý je vhodný pre selektívnu retenciu a zakoncentrovanie nízkomolekulárneho analytu, rozšíril jeho použitie aj ako stacionárnej fázy typu RAM pre priame nástreky biologic-kej matrice (plazma, moč⁴⁹). Možnosťou pre zvýšenie repro-dukovateľnosti SPE, resp. redukcii objemu organických rozpúšťadiel, môžu byť v niektorých prípadoch extrakčné disky, ktoré kombinujú princíp hydrofóbných a iónovo-výmenných interakcií a tým dosahujú vyššiu selektivitu⁵⁰. Aj keď ich nevýhodou je nižšia sorpčná kapacita, boli aplikované napríklad pre stanovenie enantiomérov meta-donu v sére, resp. v krvi⁵¹. Vyššia selektivita a výťažnosť extrakcie pre bážické látky môže byť dosiahnutá aj vhod-ným spojením rôznych extrakčných princípov, akými sú nešpecifická hydrofóbná izolácia na neporóznom uhlíko-vom sorbente a následná extrakcia na vhodnom katióno-vom meniči (napr. propylsulfónová kyselina viazaná na silikagélovom nosiči)⁵². Ďalšia možnosť predúpravy bio-logickej vzorky je reprezentovaná zaradením dialýzy ako predúpravného kroku v plne automatizovanom analytic-kom systéme a bola využitá pre extrakciu (RS)-verapamilu a (RS)-norverapamilu z ľudskej plazmy⁵³.

3. 2. Kapilárna elektroforéza (CE)

Často využívanou alternatívou pre dosiahnutie zvý-šenej selektivity chirálnych separácií v CE je prídavok chirálneho selektora k základnému elektrolytu^{54,55}. Medzi najčastejšie používané chirálne selektory patria cyklodex-tríny (CD) a ich deriváty⁵⁶, proteíny⁵⁷, polysacharidy, ma-krocyclické antibiotiká, atď. Okrem výberu vhodného typu selektora je dôležitá optimalizácia ďalších parametrov ako koncentrácia chirálneho selektora, pH, typ a iónová sila

pufrov, percentuálny podiel organického modifikátora. Prehľadový referát Fanalihu a kol.⁵⁴ podrobne diskutuje rôzne elektroforetické prístupy (kapilárna zónová elektro-foréza, CZE; elektrokinetická chromatografia, EKC; kapi-lárna gélová elektroforéza, CGE; kapilárna elektrochroma-tografia, CEC), separačné princípy ako i mechanizmy chi-rálneho rozlíšenia racemátov rôznych analytov (liečivá, aminokyseliny a pod.). Výhodou CE i MEKC (micelárna elektrokinetická kapilárna chromatografia)⁵⁸ pre chirálne separácie je možnosť použitia chirálneho selektora⁵⁶ v podobe pseudostacionárnej chirálnej fázy. Metódy CE vykazujú pritom dostatočnú účinnosť, rýchlosť separácie a spravidla i dobré rozlíšenie pri pomerne jednoduchom analytickom usporiadaní. Výhodou je dosiahnutie vysokej separačnej účinnosti, malé objemy vzoriek a používaných pufrov (resp. organických rozpúšťadiel). Limitujúcim faktorom predovšetkým (pre monitorovanie tzv. terapeutických koncentrácií liečiv) sú v praxi dosahované vysoké detekčné limity a nižšia reprodukovateľnosť. Aj keď čiastočné zlepšenie môže byť dosiahnuté pomocou tzv. zakoncentrovania vzorky („sample stacking“), zásadnejšie riešenie spočíva v nasadení citlivejších detekčných metód akou je UV (napr. LIFD, t.j. laser induced fluorescence detection^{18,59}). Pre stereoselektívne stanovenie (±)-terbutalínu a (±)-efedrinu v moči bola využitá aj metóda CE/MS (cit.⁶⁰) umožňujúca monitorovanie látok na rádovo nižších hladinách koncentrácií v porovnaní s UV detekciou. Nový prístup pre citlivú chirálnu analýzu CZE je založený na použití on-line kombinácie dvoch kapilár s „chirálnym“ a „achirálnym“ systémom⁶¹. Analytický proces prebieha v dvoch krokoch, pričom chirálna separácia je uskutočnená v prvej kapiláre so základným elektrolytom (napr. acetátový pufo) s vhodným chirálnym selektorom (napr. aspartam, resp. L-OH-prolin) a separované enantioméry sú ďalej detegované v druhej kapiláre. Ako testované látky boli použité alfa-hydroxykarboxylové kyseliny a dosiahnutý detekčný limit bol 10⁻¹⁸ mol (cit.⁶¹). Aj keď metóda kapilárnej elektroforézy je principiálne vhodná pre priamy nástrek biologickej matrice, podobne ako v HPLC, uplatnenie našli aj konvenčné extrakčné postupy (napr. pri stanovení enantiomérov warfarínu v plazme⁶², bupivakainu v sére⁶³, verapamilu a norverapamilu v plazme⁶⁴, oxprenololu v moči⁶⁵, zopiklonu v moči a slinách¹⁸). Rôzne možnosti konvenčných i nekonvenčných techník predúpravy v porovnaní s priamym nástrekom biologických vzoriek (predovšetkým plazmy, séra, moču a slín) v podmienkach CE, MEKC, resp. izotachoforézy (ITP), sa diskutovali pre celý rad príkladov nestereoselektívneho, resp. stereoselektívneho stanovenia

rôznych chirálnych liečiv^{66,69}. Výhodnejšie ako nepriame konvenčné techniky predúpravy vzorky je predradenie ITP, alebo zakoncentrovanie analytu priamym napojením pred-systému ku kapiláre. Uplatnenie nachádza o.i. princíp chromatografický (malé množstvo stacionárnej fázy je imobilizované medzi dve frity na začiatku kapiláry). Pre zlepšenie citlivosti metódy sa modifikovala a aplikovala LLE vzoriek v dvoch stupňoch s následnou on-line kombináciou SPE-CE (použitie reverzne-fázového sorbentu na báze divinylbenzénu) a dosiahla sa rýchla, reprodukovateľná a kvantitatívna analýza izoforiem metalotioneínu v pečňových extraktech pre koncentrácie 0,5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ tkaniva⁷⁰.

4. Priame nástreky biologického materiálu

4.1. Stacionárne fázy typu RAM

Princíp stacionárnych fáz typu RAM (restricted access materials) kombinujúcich vylučovací mechanizmus pre odstránenie vysokomolekulárnych komponentov z matrice interakciou na vonkajšom hydrofilnom (biokompatibilnom) povrchu a zakoncentrovanie nízkomolekulárnych analytov na vnútornom hydrofóbnom povrchu stacionárnej fázy umožňuje priamu a opakovanú analýzu liečiv v biologických matriciach^{37,71-75}. Pinkerton⁷¹ prehladne zhodnotil vlastnosti RAM pre priamy nástrek biologických vzoriek: a) odolnosť voči ireverzibilnej kontaminácii makromolekulami na základe ich prakticky kvantitatívnej (98 %) elúcie a b) dostatečná selektivita a účinnosť pre rozlíšenie analytov od endogénnych, resp. interferujúcich zložiek. Celkovo je známych niekoľko modifikácií RAM. V súčasnosti sa najčastejšie aplikujú predovšetkým stacionárne fázy typu ISRP zavedené Hagestamom a Pinkertonom („internal surface reverse phases“, t.j. diolové skupiny na vonkajšom povrchu a polypeptidické fázy viazané na vnútorný povrch silikagélu)^{71,73}. Boos a kol.^{72,76,77} rozpracovali teóriu i aplikácie ISRP typu alkyl-diol silikagél (ADS), charakterizovanú hydrofilnými diolovými skupinami na vonkajšom a butyryl-(C₄)-, kapryloyl-(C₈)-, resp. stearoyl-(C₁₈)-skupinami na vnútornom povrchu. Medzi ďalšie modifikácie RAM patria: SHP („shielded hydrophobic phases“, napr. silikagél obsahujúci polymérnu hydrofilnú sieť polyetylén-glykolu (PEG) s pevne zakotvenými hydrofóbnymi fenylovými skupinami)^{78,79}, SPS („semi-permeable surface phases“, napr. adsorpcia neiónovej povrchovo-aktívnej látky, ktorá obsahuje PEG, na reverzne fázový povrch (C₈, C₁₈), resp. kombinácia alkylsilanu/PEG-silanov viazaných

na poróznom povrchu)⁸⁰⁻⁸¹, DZM („dual zone materials“, napr. perfluorobutyletylendimetylsilylové skupiny v kombinácii s C₁₈)⁸² alebo MFP („mixed-functional phase“, napr. β -cyklodextrín, resp. fenylové, butylové a oktylové skupiny v kombinácii s diolovou fázou)⁸³⁻⁸⁵. Osobitná skupina stacionárnych fáz typu RAM je založená na biošpecifickej interakcii (a vysokej afinite) liečiva k imobilizovanému selektoru (protein, resp. enzým). Uvedený prístup bol uplatnený pre karbonátdehydratázu (CA) pri priamom monitorovaní sulfónamidov v moči, resp. v plazme⁸⁶. Imobilizácia enzýmu CA poskytla vyššiu špecificitu a selektivitu v porovnaní s albumínom (BSA)⁸⁷. Podobným riešením je i vytvorenie biokompatibilného vonkajšieho povrchu imobilizovaním plazmatického a₁⁻ kyslého glykoproteínu (AGP)⁸⁸.

4.2. HPLC-integrovaná predúprava biologickej vzorky

Konvenčné spôsoby extrakcie chirálnych analytov/ enantiomérov z komplexných biologických matric (hemolyzovaná krv, plazma, sérum, sliny, homogenáty tkanív a pod.) je možné nahradiť HPLC-integrovanou predúpravou vzorky („on-line liquid-solid extraction“, LSE) využitím stacionárnych fáz typu RAM a rôznych alternatív a inštrumentálnych modifikácií „column-switching“ (CSW) technik. Ak predúprava vzorky nepresahuje čas analýzy, paralelne s analytickou separáciou môže prebiehať predúprava vzorky nasledovnej. Vývoj metódy pre priamy nástrek biologickej matrice konkrétneho analytu spočíva v dosiahnutí optimálneho časového intervalu medzi frakciou biologického vzorky (kompletnou elúciou matrice), prenosom analytu z predkolóny na analytickú kolónu a následnou analytickou separáciou analytu⁸⁹. Výhody metodológie spočívajú v možnosti plnej automatizácie (skrátene času analýzy), v dosiahnutí prakticky kvantitatívnej výťažnosti, vyššej citlivosti, správnosti a presnosti. Sú vhodné pre analýzu infekčných alebo inak kontaminovaných biologických vzoriek a nevyžadujú internú štandardizáciu^{37,72,76}. Tabuľka II sumarizuje najdôležitejšie, analyticky relevantné aspekty LSE v porovnaní s LLE a SPE. Rozdielna hydrofóbnosť a selektivita troch typov ADS stacionárnych fáz umožňuje optimálny výber vzhľadom na stanovovaný analyt a biologickú matricu. O širších možnostiach zatiaľ „nesteroselektívnych“ aplikácií pre rôzne analyty svedčia integrované predúpravy C₁₈-ADS opísané pre (\pm)-bupivakain v plazme⁹⁰; kortizol a prednizolon v plazme, arachidonovú kyselinu v moči⁷⁷; digoxin v sére⁹¹ alebo C₈-ADS

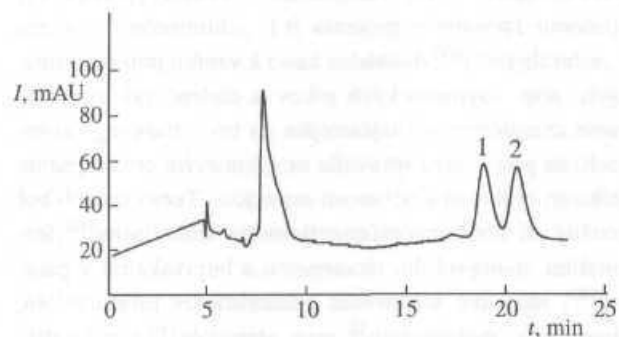
Tabuľka II

Výhody a nevýhody konvenčných predúpravných techník (LLE, SPE) v porovnaní s LSE

Hodnotiace parametre	LLE	SPE	LSE
Svetelná expozícia vzorky	značná	relatívne malá	minimálna
Časová náročnosť	značná	relatívna	minimálna
Automatizácia	nie	čiasťočná alebo úplná	spravidla úplná
Použitie interného štandardu	spravidla nevyhnutné	spravidla nevyhnutné	spravidla nie je potrebné
Výťažnosť	variabilná	variabilná	vysoká
Inštrumentálna náročnosť	minimálna	rôzna, podľa stupňa automatizácie	značná
Spotreba organických rozpúšťadiel	značná	nízka	minimálna

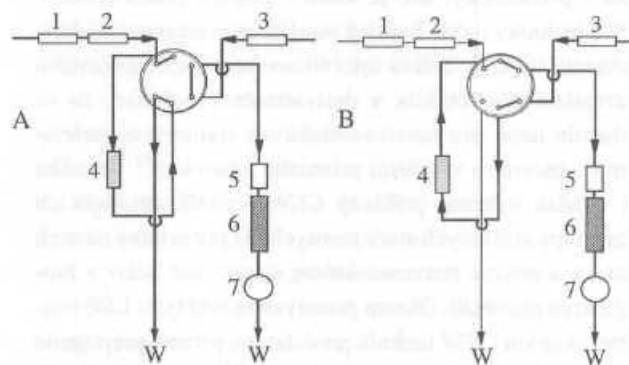
pre stanovenie fotoreaktívneho 8-metoxypsoralenu v plazme⁷⁶ a C₄-ADS pre sulfidopeptidové leukotriény v moči a bunkových extraktech⁹², resp. pre stereoselektívne HPLC stanovenie (*R*)- a (*S*)-propranololu v mikrodiályzáte krvi a mozgomiešnom moku s následnou separáciou na ovomukoidovej chirálnej stacionárnej fáze³⁴ (obr. 1).

HPLC-integrovaná predúprava vzoriek je aktuálna v prípade nestereoselektívnej i stereoselektívnej bioanalýzy chirálnych liečiv technikami CSW (cit.⁹³). Medzi často používané alternatívy patrí tzv. „back-flush“ zapojenie - elúcia retardovaného analytu nastáva zaradením opačného smeru toku mobilnej fázy. Inštrumentálne prevedenie „back-flush“ techniky je možné v tzv. jednopumpovom systéme (napr. pre stanovenie enantiomérov propranololu v mikrodiály-



Obr. 1. Stanovenie (i)- (1) a (*S*)-propranololu (2) v mikrodiályzáte krvi potkana získanom 45 min po i.v. podaní (*RS*)-propranololu (10 mg.kg⁻¹). Chromatografické podmienky: predkolóna: LiChrospher® RP-ADS (25 x 4 mm I.D., 25 µm); Ultron ES-OVM (25 x 4 mm I.D.); analytická kolóna: Ultron ES-OVM (150 x 4,6 mm I.D., 5 µm); fluorescenčná detekcia (λ_{ex} = 290 nm, λ_{em} = 340 nm); gradient mobilnej fázy: 20 mmol.l⁻¹ fosfátový pufoľ (pH = 6,9) a acetonitril: 0-5 min: 5 %; 5-6 min: 45 %; 6,1-18 min: 20-23 %; 18,1-25 min: 23 %; prietok: 0,8-1,1 ml.min⁻¹; teplota: 15 °C; dávkovaný objem: 20 µl

záte krvi a v mozgomiešnom moku³⁴), resp. v dvoj pumpovom systéme (analýza: (+)- a (-)-pantoprazolu v plazme⁹⁴; enantiomérov propranololu v plazme, krvi a homogenátoch tkanív⁹⁵, atď.) (obr. 2). Zaradenie druhého prepínacieho ventilu do CSW systému môže navyše poskytnúť možnosť kombinácie „back-flush“ spôsobu a tzv. „cutting“ techniky pre sledovaný analyt (pindolol) v zmesi s inými látkami (lidokain, metoprolol, oxprenolol, diltiazem, verapamil), resp. jeho následnú stereoselektívnu separáciu⁹⁶. V prípade, že separácia vyžaduje kratší čas, než predúprava vzorky, inštalovanie prídavného prepínacieho ventilu a druhej predkolóny (tzv. „alternatívna predkolónová CSW technika“) môže prispieť k redukcii celkového času analýzy⁹⁹. Niektorí autori uprednostňujú tzv. „forward-flush“ zapojenie^{97,98}, pri ktorom elúcia analytu nastáva v priamom



Obr. 2. Schematický diagram tzv. dvoj pumpového „column-switching“ systému v „back-flush“ zapojení. A: dávkovanie matrice vzorky na predkolónu v priamom smere toku mobilnej fázy a súčasne kondicionovanie analytickej kolóny; B: prenos analytu v „back-flush“ prepojení na analytickú kolónu a následná analytická separácia; 1, 3 - HPLC pumpy, 2 - autosampler, 4 - predkolóna (typu RAM), 5 - analytická predkolóna, 6 - analytická kolóna, 7 - detektor, W - odpad

Tabulka III

Prehľad niektorých stereoselektívnych stanovení liečiv s priamym nástrekom biologickej matrice

Liečivo	Chirálna analytická kolóna	Matrica	Objem nástreku [μl]	Detekcia	LOD [ng.ml ⁻¹]	Cit.
(±)-Pantoprazol	tris(4-metylbenzoát) celulózy ^c	plazma	100	UV	100	94
E2020 ^g	avidin	plazma	500	UV	-	134
E3810 ^h	flavoprotein	plazma	100	UV	30	132
(<i>RS</i>)-Propranolol	ovomukoid ^d	plazma, krv, homogenáty tkanív	100	FD	15	95
(<i>RS</i>)-Propranolol	ovomukoid ^d	mikrodialyzát krvi potkanov, mozgo- miešny mok	20	FD	(+)-P:10 (-)-P:15	34
(<i>RS</i>)-Metoprolol, (<i>RS</i>)-Alprenolol, (<i>RS</i>)-Propranolol	celobiohydroláza CBH-1 ^e	mikrodialyzát krvi a mozgového tkaniva potkanov	8	FD	20 ^a , 40 ^b 8 ^a , 150 ^b 25 ^a , 50 ^b	33
(<i>RS</i>)-Ketoprofen, (±)-oxazepam (±)-chlórpheniramin, (±)-benzoin	ovomukoid ^f	sérum	20	UV	-	133

^a LOD pre (*S*)-enantioméry v dialyzáte krvi; ^b LOD pre (*S*)-enantioméry v dialyzáte mozgového tkaniva; FD - fluorescenčná detekcia; ^c Chiralcel OJ-R (Daicel Chemical Ind., Tokyo, Japan); ^d Ultron ES-OVM (Shinwa Chemical Ind., KYOTO, Japan); ^e TrichSep®-100 (Skandinaviska Gene Tec AB, Gothenburg, Sweden); ^f Ultron-NH₂ (Shinwa Chemical Ind., Tokyo, Japan) imobilizovaný s DSC (N,N'-disukcinimidylový uhličitan); ^g E2020 - (±)-1-benzyl-4-[(5,6-dimetoxy-1-indanon)-2-yl]methylpiperidin hydrochlorid; ^h E3810 - (±)-sodium 2-[[[4-(3-metoxypoxy)-3-metyl-pyridin-2-yl]methyl]sulfinyl]-1*H*-benzimidazol

smere toku mobilnej fázy (eliminuje sa tým možnosť kontaminácie analytickej kolóny rezíduami biologickej matrice z predkolóny, ako je tomu v prípade „back-flush“). CSW techniky môžu byť tiež použité pre integrovanú derivatizáciu vzoriek liečiva imobilizovaním fluorescenčného derivatizačného činidla v derivatizačnej kolónke, čo sa uplatnilo napr. pre nestereoselektívne stanovenie amfetaminu v plazme s využitím priameho nástreku⁹⁹. Tabulka III uvádza vybrané príklady CSW technik aplikujúcich rôzne typy chirálnych stacionárnych fáz pre priamy nástrek matrice a priame stereoselektívne stanovenie liečiv v biologickom materiáli. Okrem priamych metód typu LSE osobitnú skupinu CSW technik predstavuje priame prepojenie „achirálného“ systému s „chirálnym“¹⁰⁰ v prípade ak mu predchádza konvenčná extrakcia biologickej vzorky. Boli použité v prípade extenzívne metabolizovaných liečiv (s predpokladanou prítomnosťou viacerých štrukturálne príbuzných chirálnych metabolitov) pre ciele stereoselektívnu separáciu sledovaného analytu. Príkladom je stanovenie enantiomérov cyklofosfamidu v sére¹⁰¹, ifosfamidu v sére¹⁰², ibutilidu a artilidu v plazme (po deriva-

tizácii)¹⁰³; meflokinu v plazme¹⁰⁴; zopiklonu v moči¹⁰⁵ a ketoprofenu¹⁰⁶, resp. verapamilu¹⁰⁷ v ľudskej plazme. Pri opačnom spôsobe prepojenia (t.j. „chirálného“ systému s „achirálnym“)¹⁰⁰ dochádza často k vzniku pomerne širokých, resp. asymetrických píkav a ciele zakoncentrovanie enantiomérov (najčastejšie na tzv. „trapping“ kolónach) sa preto stáva spravidla nevyhnutným pre zlepšenie celkovej citlivosti a účinnosti separácie. Tento spôsob bol použitý pri monitorovaní enantiomérov amlodipinu¹⁰⁸, terbutalínu, metoprololu, oxazepamu a bupivakainu v plazme¹⁰⁹, resp. pre stanovenie enantiomérov propranololu, alprenololu, metoprololu³³, resp. atenololu¹¹⁰ v mikrodialyzáte krvi a mozgového tkaniva.

5. Validácia stereoselektívnych bioanalytických metód s priamym nástrekom biologického materiálu

Validácia stereoselektívnych analytických metód je v zásade podobná ako v prípade metód nestereoselektív-

nych¹¹, mala by však navyše zohľadniť aj možnú stereo-konverziu enantioméru^{10,112-114}, resp. jeho racemizáciu (vplyvom teploty, pH, precipitáciou bielkovín, derivatizáciou atď.)^{112,115}. Preto by „klasický“ spôsob validácie mal byť urobený zvlášť pre racemát a jednotlivé enantioméry^{112,116}, teda: *a*) Limit detekcie (LOD) a medzastanovenia (LOQ) musia byť určené pre každý enantiomér. Špecifické pomery každého enantioméru v racemickej zmesi musia byť kombinované tak, aby sa určil LOD, resp. LOQ jedného enantioméru v prítomnosti jeho antipodu, *b*) Presnosť a správnosť musia byť stanovené pre enantioméry pri analyticky (bioanalyticky) relevantných koncentráciách. Zachovanie pomeru enantiomérov v racemickej zmesi musí byť dosiahnuté opakovanými meraniami, spravidla v rozsahu kalibračnej krivky, *c*) Linearita metódy je hodnotená na základe kalibračných kriviek, pričom sú možné v zásade 3 spôsoby ich prípravy:

- 1) zhotovenie kalibračných kriviek zvlášť pre každý enantiomér. Pozornosť si pritom zasluhuje skutočnosť, že strmnosť oboch kriviek, resp. detekčné limity môžu byť rozdielne pre jednotlivé enantioméry (t.j. rôzny tvar píku, chvostovanie atď.).
- 2) zhotovenie kalibračných kriviek pre reprezentatívne pomery enantiomérov (+) a (-) (t.j. 100/0, 95/5, 75/25, 60/40, 40/60, 25/75, 5/95, 0/100). Uvedené riešenie poskytuje súčasne i optimálny variant validácie z hľadiska časového a metódy je vhodné uplatniť pri priamej kvantifikácii enantiomérov.
- 3) zhotovenie kalibračných kriviek paralelne pre rôzne pomery jednotlivých enantiomérov (+) a (-) a racemátu (\pm) v rovnakej vzorke, čo umožňuje stanovenie rôznych koncentrácií enantiomérov pri minimálnom počte vzoriek (je možné zostrojiť 3 krivky, súčasne pre enantioméry i pre racemát, pre zvolený celkový počet 9 kalibračných vzoriek). Osobitným problémom pri validácii zostávajú kritériá pre stabilitu, stereokonverziu, separáciu enantiomérov, výťažnosť a na niektoré špecifické aspekty (v prípade rozdielnych mobilných fáz pri CSW technikách môže dochádzať k zmene v tvare resp. výške píku, čo nemusí bezpodmienečne súvisieť so stratou analytu, resp. zníženou výťažnosťou)¹¹².

6. Záver

Exaktné stanovenie koncentrácie enantiomérov (resp. opticky aktívnych metabolitov) chirálnych liečiv v „konvenčných“ i „nekonvenčných“ biologických maticiacich re-

prezentujúcich rôzne zložky organizmu je mimoriadne dôležité pre správnu interpretáciu farmakokinetických a toxikokinetických dát. Vychádzajúc z týchto požiadaviek, bola okrem dynamicky sa rozvíjajúcich možností kapilárnej elektroforézy otvorená aj možnosť HPLC-integrovannej predúpravy (LSE) biologických vzoriek. Nesporné výhody LSE (vrátane inštrumentálnych alternatív pre rôzne aplikácie a v neposlednom rade i širšia komerčná dostupnosť vhodných analytických kolón, resp. predkolón typu RAM) spôsobili, že sa táto metóda v čoraz väčšom počte prípadov stáva vhodnou bioanalytickou voľbou a riešením.

LITERATÚRA

1. Ariens E. J.: *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 26, 663 (1984).
2. Jamali F., Mehvar R., Pasutto F.M.: *J. Pharm. Sci.* 78, 695 (1989).
3. Tucker G. T., Lennard M. S.: *Pharmac. Ther.* 45, 309 (1990).
4. Eichelbaum M., Gross A. S.: *Adv. Drug Res.* 28, 1 (1996).
5. Hof R. P., Ruegg U. T., Hof A., Vogel A.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 7, 689 (1985).
6. Hof R. P., Hof A., Ruegg U. T., Cook N. S., Vogel A.: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 8, 221 (1986).
7. Triggle D. J.: *Chirality* 6, 58 (1994).
8. Kwon Y.-W., Triggle D. J.: *Chirality* 3, 393 (1991).
9. Herve F., Urien S., Albengres E., Duché J.-C., Tillement J.-P.: *Clin. Pharmacokin.* 26, 44 (1994).
10. Caldwell I.: *J. Clin. Pharmacol.* 32, 925 (1992).
11. Eichelbaum M.: *Biochem. Pharmacol.* 37, 93 (1988).
12. Gilar M., Tesařová E., Patzelová V., Deyl Z.: *Chem. Listy* 88, 514 (1994).
13. Pichini S., Altieri I., Zuccaro P., Pacifici R.: *Clin. Pharmacokin.* 30, 211 (1996).
14. Jusko W. J., Milsap R. L.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694, 36 (1993).
15. Haeckel R.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694, 128 (1993).
16. Wilson J. T.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 694, 48 (1993).
17. Höld K. M., de Boer D., Soedirman J. R., Zuidema J., Maes R. A. A.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1401 (1995).
18. Hempel G., Blaschke G.: *J. Chromatogr. B* 675, 139 (1996).
19. Netter P., Bannwarth B., Royer-Morrot M.-J.: *Clin. Pharmacokin.* 17, 145 (1989).
20. Day R. O., Williams K. M., Graham G. G., Lee E. I.,

- Knihinicki R. D., Champion G. D.: *Clin. Pharmacol. Ther.* 43, 480 (1988).
21. Brocks D. R., Jamali F., Russell A. S.: *J. Clin. Pharmacol.* 31, 741 (1991).
 22. Brocks D. R., Jamali F.: *Drug Metab. Dispos.* 18, 471 (1990).
 23. Wright J. D., Boudinot F. D., Ujhelyi M. R.: *Clin. Pharmacokinet.* 30, 445 (1996).
 24. Shibukawa A., Nagao M., Kuroda Y., Nakagawa T.: *Anal. Chem.* 62, 712(1990).
 25. Shibukawa A., Terakita A., He J., Nakagawa T.: *J. Pharm.Sci.* 81, 710 (1992).
 26. Shibukawa A., Nagao M., Terakita A., He J., Nakagawa T.: *J. Liq. Chromatogr.* 16, 903 (1993).
 27. Shibukawa A., Nakao C., Sawada T., Terakita A., Morokoshi N., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 868 (1994).
 28. Ohara T., Shibukawa A., Nakagawa T.: *Anal. Chem.* 67, 3520(1995).
 29. Shibukawa A., Yoshimoto Y., Ohara T., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 83, 616 (1994).
 30. Telting-Diaz M., Scott D. O., Lunte C. E.: *Anal. Chem.* 64, 806(1992).
 31. Hogan B. L., Lunte S. M., Stobaugh J.F., Lunte C. E.: *Anal. Chem.* 66, 596 (1994).
 32. Chen A., Lunte C. E.: *J. Chromatogr. A* 697, 29 (1995).
 33. Johansson M., Sjöberg P., Hesselgren A.-M., Salmonson T.: *Chirality* 7, 290 (1995).
 34. Oravcová J., Štefancová A., Mišlanová Cs., Horecký J., Trnovec T., Lindner W.: *doteraz nepublikované*.
 35. Herrera A. M., Scott D. O., Lunte C. E.: *Pharm. Res.* 7, 1077(1990).
 36. Sarre S., van Belle K., Smolders I., Krieken G., Michotte Y.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 735 (1992).
 37. Anderson D. J.: *Anal. Chem.* 12, 434R (1993).
 38. Geisslinger G., Menzel S., Brune K.: *J. Chromatogr. B* 675, 77 (1996).
 39. Procházková D., Štambergová A., Drašar P.: *Chem. Listy* 89, 634 (1995).
 40. Lim Ch.-K.: *Adv. Chromatogr.* 32, 1 (1992).
 41. Guenu S., Hennion M.-C.: *J. Chromatogr. A* 725, 57 (1996).
 42. Chiantore O., Novák I., Berek D.: *Anal. Chem.* 60, 638 (1988).
 43. Unger K. K.: *Anal. Chem.* 55, 361A (1983).
 44. Nagaoka S., Ihara H., Honbo J., Hirayama Ch., Kuriaki H., Ikegami S.: *Anal. Sci.* 10, 543 (1994).
 45. Andreolini F., Borra C., Caccamo F., Di Corcia A., Samperi R.: *Anal. Chem.* 59, 1720 (1987).
 46. Andreolini F., Borra C., Di Corcia A., Samperi R., Raponi G.: *J. Chromatogr. B* 337, 379 (1985).
 47. Carfagnini G., Di Corcia A., Marchetti M., Samperi R.: *J. Chromatogr.* 530, 359 (1990).
 48. Rumiantsev D. O., Ivanova T. V.: *J. Chromatogr. B* 674, 301 (1995).
 49. Beth M., Unger K. K., Tsyurupa M. P., Davankov V. A.: *Chromatographia* 36, 351 (1993).
 50. Rudaz S., Haerdi W., Veuthey J.-L.: *Chromatographia* 44, 283(1997).
 51. Rudaz S., Veuthey J.-L.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 74, 1271 (1996).
 52. Cosbey S. H., Craig I., Gill R.: *J. Chromatogr. B* 669, 229(1995).
 53. Ceccato A., Chiap P., Hubert Ph., Toussaint B., Crommen J.: *J. Chromatogr. A* 750, 351 (1996).
 54. Fanali S., Cristalli M., Vespalec R., Boček P.: *Adv. Electrophoresis* 7, 3 (1994).
 55. Gübitz G., Schmid M. G.: *J. Chromatogr. A* 792, 179(1997).
 56. Bressolle F., Audran M., Pham T.-N., Vallon J.-J.: *J. Chromatogr. B* 687, 303 (1996).
 57. Lloyd D. K., Aubry A.-F., De Lorenzi E.: *J. Chromatogr. A* 792, 349 (1997).
 58. Riekkola M. L., Wiedmer S. K., Valkó I. E., Sirén H.: *J. Chromatogr. A* 792, 13 (1997).
 59. Prichett T., Evangelista R. A., Chen F. T. A.: *Bio/Technology* 73, 1449 (1995).
 60. Sheppard R. L., Tong X., Cai J., Henion J. D.: *Anal. Chem.* 67, 2054 (1995).
 61. Krásenský S., Fanali S., Křivánková L., Boček P.: *Electrophoresis* 76, 968 (1995).
 62. Gareil P., Gramond J. P., Guyon F.: *J. Chromatogr. B* 675, 317(1993).
 63. Soini H., Riekkola M. L., Novotny M. V.: *J. Chromatogr.* 608, 265 (1992).
 64. Dethy J. M., de Broux S., Lesne M., Longstreth J., Gilbert P.: *J. Chromatogr. B* 654, 121 (1994).
 65. Li F., Cooper S. F., Mikkelsen S. R.: *J. Chromatogr. B* 674, 277 (1995).
 66. Lloyd D. K.: *J. Chromatogr. A* 735, 29 (1996).
 67. Thormann W., Zhang Ch.-X., Schmutz A.: *Ther. Drug. Monit.* 78, 506 (1996).
 68. Nguyen N. T., Siegler R. W.: *J. Chromatogr. A* 735, 123(1996).
 69. Steimann L., Thormann W.: *Electrophoresis* 77, 1348 (1996).

70. Knudsen C. B., Beattie J. H.: *J. Chromatogr. A* 792, 463(1997)
71. Pinkerton T. C.: *J. Chromatogr.* 544, 13 (1991).
72. Boos K. S., Rudolph A., Vielhauer S., Walfort A., Lubda D., Eisenbeiss F.: *Fresenius J. Anal. Chem.* 352,684(1995).
73. Hagestam I. H., Pinkerton T. C.: *Anal. Chem.* 57, 1757 (1985).
74. Unger K. K.: *Chromatographia* 31, 507 (1991).
75. Kimata K., Hosoya K., Tanaka N., Araki T., Tsuboi R., Haginaka J.: *J. Chromatogr.* 558, 19 (1991).
76. Vielhauer S., Rudolph A., Boos K.-S., Seidel D.: *J. Chromatogr. B* 666, 315 (1995).
77. van der Hoeven R.A. M., Hofte A. J. P., Frenay M., Irth H., Tjaden U. R., van der Greef J., Rudolph A., Boos K. S., Marko-Varga G., Edholm L. E.: *J. Chromatogr. A* 762, 193(1997).
78. Gisch D. J., Hunter B. T., Feibush B.: *J. Chromatogr. B* 433, 264(1988).
79. Feibush B., Santasania C. T.: *J. Chromatogr.* 544, 41 (1991).
80. Desilets C. P., Rounds M. A., Regnier F. E.: *J. Chromatogr.* 544, 25 (1991).
81. Wang H., Desilets C., Regnier F. E.: *Anal. Chem.* 64, 2821(1992).
82. Williams D. E., Kabra P. M.: *Anal. Chem.* 62, 807 (1990).
83. Haginaka J., Wakai J.: *Anal. Chem.* 62, 997 (1990).
84. Haginaka J., Wakai J., Yasuda H.: *J. Chromatogr.* 535, 163(1990).
85. Kanda T., Kutsuna H., Ohtsu Y., Yamaguchi M.: *J. Chromatogr. A* 672, 51 (1994).
86. Ohta T., Takamiya I., Takitani S.: *Biomed. Chromatogr.* 8, 184 (1994).
87. Matsuura A., Nagayama T., Kitagawa T.: *J. Chromatogr. B* 617, 339 (1993).
88. Hermansson J., Grahn A.: *J. Chromatogr. A* 660, 119 (1994).
89. Operačný manuál LiChrospher® ADS for HPLC-integrated sample preparation. Merck, Darmstadt 1997.
90. Yu Z., Westerlund D.: *J. Chromatogr. A* 725, 149 (1996).
91. Oosterkamp A. J., Irth H., Beth M., Unger K. K., Tjaden U. R., van der Greef J.: *J. Chromatogr. B* 653, 55 (1994).
92. Oosterkamp A. I., Irth H., Heintz L., Marko-Varga G., Tjaden U. R., van der Greef J.: *Anal. Chem.* 68, 4101 (1996).
93. Campíns-Falcó P., Herráez-Hernández R., Sevillano-Cabeza A.: *J. Chromatogr.* 619, 177(1993).
94. Tanaka M., Yamazaki H.: *Anal. Chem.* 68, 1513 (1996).
95. Tamai G., Edani M., Imai H.: *Biomed. Chromatogr.* 4, 157 (1990).
96. Mangani F., Luck G., Fraudeau Ch., Vérette E.: *J. Chromatogr. A* 762, 235 (1997).
97. Lecaillon J. B., Souppart C., Le Duigou F., Dubois J. P.: *J. Chromatogr.* 497, 223 (1989).
98. Lacroix C., Phan Hoang T., Wojciechowski F., Duwoos H., Nouveau J., Diquet B.: *J. Chromatogr. B* 525, 240 (1990).
99. Zhou F.-X., Krull I. S., Feibush B.: *J. Chromatogr.* 609, 103(1992).
100. Fried K., Wainer I. W.: *J. Chromatogr. B* 689, 91 (1997).
101. Corlett S. A., Chrystyn H.: *J. Chromatogr. B* 682, 337 (1996).
102. Corlett S. A., Chrystyn H.: *J. Chromatogr. B* 654, 152 (1994).
103. Hsu Ch. L., Walters R. R.: *J. Chromatogr. B* 667, 115 (1995).
104. Gimenez F., Dumartin C., Wainer I. W., Farinotti R.: *J. Chromatogr. B* 619, 161 (1993).
105. Fernandez C., Gimenez F., Baune B., Maradeix V., Thuillier A., Farinotti R.: *J. Chromatogr. B* 617, 271 (1993).
106. Oda Y., Asakawa N., Yoshida Y., Sato T.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10, 81 (1992).
107. Oda Y., Asakawa N., Kajima T., Yoshida Y., Sato T.: *J. Chromatogr.* 541, 411 (1991).
108. Josefsson M., Norlander B.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 75,267(1996).
109. Walhagen A., Edholm L.-E.: *J. Chromatogr.* 473, 371 (1989).
110. Fornstedt T., Hesselgren A.-M., Johansson M.: *Chirality* 9, 329(1997).
111. Bressolle F., Bromet-Petit M., Audran M.: *J. Chromatogr. B* 686, 3 (1996).
112. Ducharme J., Fernandez C., Gimenez F., Farinotti R.: *J. Chromatogr. B* 686, 65 (1996).
113. Mayer J. M.: *Acta Pharm. Nord.* 2, 197 (1990).
114. Eriksson T., Björkman S., Roth B., Fyge A., Höglund P.: *Chirality* 7, 44(1995).
115. Reist M., Testa B., Carrupt P. A., Jung M., Schurig V.: *Chirality* 7, 396(1995).
116. Shah V. P., Midha K. K., Dighe S., McGilveray I. J., Skelly J. P., Yacobi A., Layloff T., Viswanathan C. T.,

- Cook C. E., McDowall R. D., Pittman K. A., Spector S.: *Pharm. Res.* 9, 588 (1992).
117. Foster R. T., Caillé G., Ngoc A. H., Lemko C. H., Kherani R., Passuto F. M.: *J. Chromatogr. B* 658, 161 (1994).
118. Boulton D. W., Fawcett J. P.: *J. Chromatogr. B* 672, 103 (1995).
119. Dru J. D.-Y., Hsieh J. Y. K., Matuszewski B. K., Dobrinska M. R.: *J. Chromatogr. B* 666, 259 (1995).
120. Shimizu T., Hiraoka M., Nakanomyo H.: *J. Chromatogr. B* 674, 11 (1995).
121. Fiset C., Philippon F., Gilbert M., Turgeon J.: *J. Chromatogr. B* 672, 231 (1993).
122. Carr R. A., Pasutto F. M., Foster R. T.: *Biopharm. Drug. Disposit.* 17, 725(1996).
123. Miick W. M.: *J. Chromatogr. A* 712, 45 (1995).
124. Zhang H., Stewart J. T., Ujhelyi M.: *J. Chromatogr. B* 668, 309 (1995).
125. Bhatti M. M., Foster R. T.: *J. Chromatogr. B* 579, 361 (1992).
126. Carr R. A., Caillé G., Ngoc A. H., Foster R. T.: *J. Chromatogr. B* 668, 175 (1995).
127. Yasui H., Yamaoka K., Dote N., Nakagawa T.: *J. Pharm. Sci.* 84, 1327(1995).
128. Deng Y., Maruyama W., Dostert P., Takahashi T., Kawai M., Naoi M.: *J. Chromatogr. B* 670, 47 (1995).
129. Katagi M., Nishioka H., Nakajima K., Tsuchihashi H., Fujima H., Wada H., Nakamura K., Makino K.: *J. Chromatogr. B* 676, 35 (1996).
130. Mehvar R., Reynolds J. M., Robinson M. A., Longstreth J. A.: *Pharm. Res.* 11, 1815 (1994).
131. Egginger G., Lindner W., Brunner G., Stoschitzky K.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12, 1537 (1994).
132. Mano N., Oda Y., Takakuwa S., Chiku S., Nakata H., Asakawa N.: *J. Pharm. Sci.* 85, 903 (1996).
133. Haginaka J., Murashima T., Fujima H., Wada H.: *J. Chromatogr. B* 620, 199 (1993).
134. Oda Y., Ohe H., Asakawa N., Yoshida Y., Sato T., Nakagawa T.: *J. Liq. Chromatogr.* 15, 2997 (1992)

Cs. Mišlanová and J. Oravcová (*Institute of Preventive and Clinical Medicine, Bratislava, Slovak Republic*):
Separation Methods in the Monitoring of Chiral Drugs Using the Direct Injection of Biological Samples

The HPLC-integrated liquid-solid extraction (LSE) has several advantages for the initial „clean-up“ of biological samples as compared to conventional methods, e.g., the repeated direct injection of untreated biofluids, such as quantitative removal of the protein matrix, improved precision, accuracy, sensitivity, etc. Since these aspects are particularly important in the direct stereoselective methods, the review summarizes recent trends and relevant applications in HPLC and CE, including sampling issues, instrumentation and validation alternatives, and potential limitations concerning pharmacokinetic and toxicokinetic studies.