Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME) jako nowoczesna technika izolacji substancji leczniczych z próbek biologicznych

Anna Roszkowska

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny

Adres do korespondencji: Anna Roszkowska, Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej, Gdański Uniwersytet Medyczny, ul. Gen. J. Hallera 107, 80-416 Gdańsk, e-mail: anna.roszkowska@gumed.edu.pl

Solid phase microextraction (SPME) as a modern technique for the isolation of medications from biological samples

Laboratory analysis of exogenous compounds (e.g., medicinal substances) as well as endogenous ones (e.g., biomarkers) is a multistage process, requiring the use of advanced analytical methods that facilitate qualitative and quantitative determination of the level of a given compound in the analyzed sample. This in turn allows for the calculation of a concentration of analyte in the body, and in the case of medications – estimation of the correct dosage, drug metabolism and the risk of side effects. Modern extraction techniques of drugs from the biological matrix aim at the miniaturization of the entire procedure in order to limit the consumption of toxic compounds and reduce the amount of biological material collected from the patient. One of the modern microextraction techniques is solid-phase microextraction (SPME). It allows the extraction of even trace amounts of compounds from conventional (e.g., blood) as well as unconventional (e.g., saliva) biological matrices. Due to the simplicity and speed of SPME extraction, this technique becomes increasingly popular in pharmaceutical analysis, and also in forensic and clinical studies.

Keywords: biological material, solid-phase microextraction, drug analysis.

© Farm Pol, 2018, 74 (12): 716–721

Matryce biologiczne do oznaczania stężenia leków w organizmie

Krew oraz jej frakcje (osocze, surowica) są najczęściej używanym materiałem biologicznym w analizach farmaceutycznych [1]. Substancje lecznicze występują we krwi zarówno w formie związanej z różnymi frakcjami białek (głównie z albuminami), jak i w formie wolnej, która jest aktywna farmakologicznie. Pomiar aktywnej frakcji leku ma duże znaczenie w badaniach farmakokinetycznych, w tym w terapeutycznym monitorowaniu stężenia

leków (ang. *therapeutic drug monitoring*, TDM) w organizmie, gdyż umożliwia ocenę dostępności biologicznej leku, a także optymalizację farmakoterapii [2]. Jednakże pobór krwi jest inwazyjny i nieprzyjemny dla pacjenta, wymaga obecności wykwalifikowanego personelu medycznego oraz odpowiednich warunków przechowywania pobranych próbek. Innym, alternatywnym materiałem biologicznym pobieranym od pacjentów jest mocz. Próbkę moczu pobierane są w sposób nieinwazyjny, natomiast nie wszystkie leki wydalone są z organizmu poprzez filtrację nerkową. W organizmie substancje lecznicze ulegają reakcjom biotransformacji (np. sprzęgania z kwasem glukuronowym), a następnie mogą być eliminowane z moczem, żółcią, przez skórę, płuca lub jelita w formie metabolitów. Jedynie niewielka część leków usuwana jest z organizmu w postaci niezmienionej. Na podstawie analizy leków w próbkach moczu, możliwie jest określenie metabolizmu leków oraz szybkości ich eliminacji z organizmu, szczególnie w odniesieniu do prawidłowej i nieprawidłowej pracy nerek [3].

Na przestrzeni ostatnich lat obserwuje się ciągły wzrost zainteresowania innymi matrycami biologicznymi, których pobranie będzie proste, mniej inwazyjne i w konsekwencji mniej stresujące dla pacjentów, a jednocześnie umożliwi w sposób prosty i łatwy określenie poziomu leku w organizmie [2, 4]. Przykładem nowych, niekonwencjonalnych matryc biologicznych, w których ilościowo oznacza się leki są włosy, ślina, suche krople krwi (ang. *dried blood spots*, DBS), a nawet wydychane powietrze [5–7]. Ślina jest wodną wydzieliną gruczołów ślinowych zawierającą białka, elektrolity oraz bakterie i resztki pokarmowe. Około 99,5% śliny stanowi woda, pozostałą część stanowią związki organiczne

i nieorganiczne. Wykazano, że skład śliny zmienia się w zależności od aktualnego stanu fizjologicznego organizmu i w przyszłości badanie śliny może być równie ważnym elementem diagnostyki chorób, jak badania krwi. Ze względu na prosty sposób pobierania próbek śliny (np. poprzez stosowanie wacików chłonnych typu Salivette) inwazyjność tego procesu jest znacznie mniejsza w porównaniu do tradycyjnego pobierania krwi. Zawartość leków w ślinie zależy między innymi od odczynu pH śliny oraz od właściwości fizyko-chemicznych danej substancji leczniczej (np. stopień rozpuszczalności w wodzie). Leki hydrofilowe wydzielane są do śliny na drodze ultrafiltracji, natomiast leki hydrofobowe na drodze dyfuzji prostej. Jednakże wykazano, że stężenie leków w ślinie jest znacznie niższe w porównaniu do tego mierzonego we krwi [8, 9]. W związku z tym do oceny poziomu leków w ślinie niezbędne są wysoce czule i selektywne metody do ich izolacji i analizy.

Inną interesującą matrycą biologiczną, którą zainteresowanie wzrasta na przestrzeni ostatnich lat są próbki włosów. Włosy w przeciwieństwie do śliny czy moczu mają zdolność do gromadzenia substancji leczniczych przez długi czas. Ksenobiotyki wnikają do struktury włosa poprzez układ krwionośny. Jednakże tylko substancje lipofilowe oraz substancje o charakterze zasadowym łatwo akumulują się we włosach; substancje o charakterze kwaśnym występują we włosach na bardzo niskich poziomach. Analiza substancji zakumulowanych we włosach umożliwia ocenę ich poziomu nawet kilka miesięcy po zaprzestaniu ich przyjmowania. Dzięki temu na podstawie analizy składu włosa można określić rodzaj użytej substancji oraz przybliżony czas zażycia środków [10, 11]. Fakt ten coraz częściej wykorzystywany jest w badaniach z zakresu medycyny sądowej oraz w badaniach toksykologicznych. Nie ma natomiast wielu informacji dotyczących korelacji pomiędzy aktualnie przyjmowanymi przez pacjenta dawkami leków a ich stężeniem we włosach.

Metody izolacji leków z matryc biologicznych

Najważniejszymi etapami procesu analizy leków są izolacja związków z badanej próbki biologicznej przy użyciu odpowiedniej techniki ekstrakcyjnej oraz właściwe oznaczenie wyizolowanych związków za pomocą wybranej metody instrumentalnej. Każda próbka biologiczna (np. krew, mocz, ślina) pobrana od pacjenta jest matrycą złożoną. Oznacza to, że oprócz substancji leczniczej posiada ona szereg innych związków, w tym substancje endogenne (np. białka, aminokwasy, lipidy), które mogą zakłócić właściwą ekstrakcję i oznaczanie badanej substancji. Istotnym jest więc oczyszczenie

i przygotowanie próbki do analizy w taki sposób, aby zminimalizować wpływ innych substancji na analizę jakościową i ilościową badanego związku. Dlatego też pierwszym i jednym z najważniejszych etapów analizy leków jest właściwa ekstrakcja badanych substancji z materiału biologicznego.

W klasycznym ujęciu ekstrakcja to metoda pozwalająca na wydzielanie lub rozdzielanie składników złożonych substancji (mieszanin) pomiędzy dwie nie mieszające się ze sobą fazy. Ekstrakcja jest stosowana nie tylko w celu izolacji związków chemicznych z ich pierwotnej matrycy, ale również w celu usunięcia składników przeszkadzających w analizie końcowej oraz w celu zagęszczenia próbki, co z kolei umożliwia ilościowe oznaczenie analitu.

Tradycyjne techniki ekstrakcji leków oparte są na ekstrakcji typu ciecz-ciecz (ang. *liquid-liquid extraction*, LLE) lub na ekstrakcji do fazy stałej (ang. *solid-phase extraction*, SPE) [12]. W LLE izolacja analitów polega na wykorzystaniu różnej rozpuszczalności związków chemicznych w dwóch niemieszających się rozpuszczalnikach, w której wykorzystuje się wyższe powinowactwo analitu do jednego z rozpuszczalników organicznych. Najważniejszym etapem optymalizacji tej metody jest wybór odpowiednich rozpuszczalników organicznych w celu uzyskania wysokiej wydajności procesu ekstrakcji. Natomiast w metodzie SPE izolowane anality podzielone są pomiędzy układ fazy stałej (stacjonarnej) i fazy ciekłej. Kolumny SPE wypełnione są sorbentem (faza stała), którym zazwyczaj jest alkilowana krzemionka. Za pomocą odpowiedniego rozpuszczalnika organicznego wypłukuje się zaadsorbowany do sorbentu analit.

Jednakże obie wyżej wymienione metody posiadają szereg wad, głównie związanych z długim czasem analizy i zużyciem dużej ilości rozpuszczalników organicznych, co niekorzystnie wpływa na środowisko, a także naraża osoby pracujące na szkodliwe czynniki chemiczne. W związku z tym w ostatnich latach poszukuje się technik, które będą miniaturyzacją tradycyjnych technik. Stąd też rozwój szeregu technik mikroekstrakcji [13, 14]. Przedrostek „mikro” oznacza wykorzystanie do analizy małej objętości rozpuszczalników organicznych oraz małej ilości materiału biologicznego, a w konsekwencji zmniejszenie emisji par i gazów oraz ilości odpadów wytwarzanych w laboratoriach analitycznych. Przyczynia się to do zachowania zasad zielonej chemii, które wyznaczają postępowanie analityczne mające na celu ochronę środowiska.

Przykładem nowoczesnych technik przygotowania próbki do analizy opartych na ekstrakcji w układzie ciecz-ciecz są mikroekstrakcja do pojedynczej kropli (ang. *single-drop microextraction*, SDME) oraz dyspersyjna mikroekstrakcja ciecz – ciecz (ang.

Rycina 1. Typowe formaty SPME używane w celu ekstrakcji substancji leczniczych z różnych materiałów biologicznych

dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME) [15–17]. Zminiaturyzowaną techniką SPE są m.in. mikroekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid-phase microextraction*, SPME) oraz mikroekstrakcja do upakowanej igły (ang. *microextraction in packed syringe*, MEPS) [18, 19].

Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

Technika SPME została opracowana w latach 90. ubiegłego wieku przez profesora Janusza Pawliszyna z University of Waterloo w Kanadzie. Początkowo technika ta była stosowana do analizy próbek środowiskowych; następnie zaczęto stosować ją także w analizie produktów żywnościowych, a obecnie technika ta znajduje również zastosowanie w badaniach leków oraz substancji endogennych w różnych materiałach biologicznych, takich jak krew, ślina, a nawet tkanki stałe (np. wątroba, płuca) [20]. SPME przebiega w dwóch podstawowych etapach. Pierwszy z nich polega na zaadsorbowaniu związków na włóknie krzemionkowym pokrytym odpowiednim materiałem sorpcyjnym (faza stacjonarna). Włókno jest wystawione na działanie składników próbki, a związki w niej obecne ulegają podziałowi pomiędzy sorbent a matrycę biologiczną. W drugim etapie zaadsorbowane do sorbentu anality są wypłukiwane przy użyciu mieszaniny rozpuszczalników organicznych bądź też pod wpływem wysokiej temperatury.

Można wyróżnić dwa rodzaje ekstrakcji SPME, w zależności od charakteru substancji, którą chcemy wyekstrahować. W celu ekstrakcji związków nielotnych włókno z sorbentem zanurzane jest bezpośrednio w badanej próbce (ang. *direct immersion*, DI-SPME). Natomiast ekstrakcja substancji lotnych przebiega w fazie nadpowiechniowej, a włókno znajduje się nad badaną próbką (ang. *head space*, HS-SPME) [21]. Dzięki dostępności różnych rodzajów sorbentów istnieje możliwość doboru odpowiedniego ich składu do rodzaju analizowanych substancji. W celu uzyskania wysokiej wydajności ekstrakcji badanych związków, wybrany sorbent powinien posiadać podobny charakter do

badanych związków. Obecnie używane sorbenty są także biokompatybilne (biozgodne), co oznacza, że nie powodują reakcji uczuleniowych i mogą być użyte nawet do analiz na żywym organizmie (*in vivo*). W praktyce analitycznej do przeprowadzenia badań metodą SPME wykorzystuje się różne dostępne formaty, w tym szczotki składające się z grzebieni, bądź też cienkie włókna wielkości igły do akupunktury (**rycina 1**).

Najważniejszymi zaletami techniki SPME, poza użyciem małych ilości rozpuszczalników organicznych oraz badanych próbek, są także prostota i szybkość wykonania analizy oraz wysoka czułość. Technika ta jest szczególnie pomocna, gdy celem analizy jest identyfikacja i analiza śladowych ilości analitów, a matryca biologiczna jest bardzo złożona. Dodatkową zaletą tej techniki jest możliwość łączenia SPME z metodami instrumentalnymi, co wykorzystywane jest w analizie próbek środowiskowych (np. badanie pestycydów w wodach gruntowych) [22], produktów spożywczych [23], w badaniach klinicznych (np. poszukiwanie biomarkerów chorób) [24], a także w analizie toksykologicznej oraz w badaniach farmaceutycznych [25].

Zastosowanie SPME w analizie leków

Technika SPME jest wykorzystywana do ekstrakcji wielu leków obecnych na Liście Leków Podstawowych Światowej Organizacji Zdrowia (ang. *WHO Model List of Essential Medicines*). Dotychczas opracowano szereg protokołów dotyczących postępowania analitycznego w badaniach farmaceutycznych i biomedycznych w celu określenia poziomu leku oraz jego wpływu na przemiany biochemiczne w organizmie (badania metaboliczne). Warto podkreślić, że SPME umożliwia ekstrakcję jedynie wolnej frakcji leku, nie związanej z białkami lub innymi elementami strukturalnymi tkanek, a więc dostarcza informacji o stężeniu farmakologicznie aktywnej części leku. Możliwość prostej i szybkiej analizy ilościowej leków oraz stałego monitorowania ich poziomu w badanych próbkach biologicznych jest istotna m.in. w badaniach farmakokinetycznych, gdyż umożliwia lekarzom otrzymanie dokładnej informacji o aktualnym stężeniu leku i dobór właściwego schematu jego dawkowania. Ma to szczególne znaczenie przy terapii lekami o wąskim zakresie terapeutycznym, gdzie po przekroczeniu dawki terapeutycznej istnieje ryzyko działań toksycznych.

Przy użyciu SPME wyekstrahowano szereg leków działających na ośrodkowy układ nerwowy, takich jak opioidy, leki przeciwdepresyjne czy leki przeciwpsychotyczne z takich materiałów biologicznych jak krew, osocze, ślina czy włosy [26]. Co ciekawe, próbki włosów posłużyły również do analizy

kokainy i jej metabolitów u osób uzależnionych, a opracowana metoda SPME może być bezpośrednio zastosowana w badaniach toksykologicznych [27]. Technika SPME zastosowano również do analizy substancji psychoaktywnych w próbkach potu. Próbki pobrane zostały ze skroni przy użyciu wacików bawełnianych typu Drug Wipe, a następnie substancje wyekstrahowano z potu przy użyciu HS-SPME. Tak opracowana metoda, po odpowiedniej walidacji, mogłaby być stosowana jako alternatywny materiał biologiczny, pobrany w sposób nieinwazyjny, np. podczas rutynowej kontroli kierowców na obecność substancji uzależniających [28].

Ponadto technika SPME umożliwiła jednoczesną izolację i oznaczenie ilościowe ponad 100 związków o różnych właściwościach fizykochemicznych potencjalnie używanych jako substancje dopingowe w sporcie [29]. Użycie w pełni zautomatyzowanej i wysoce wydajnej platformy analitycznej pozwoliło na jednoczesną analizę 96 próbek moczu i znacznie zmniejszyło ogólny czas analizy; dla pojedynczej próbki wynosił on około 2 minut (rycina 2). Opracowana metoda spełnia wszystkie kryteria wymagane przez Światową Organizację Antydopingową (ang. *World Anti-Doping Agency*, WADA) dla metod analitycznych i może być stosowana do bezpośredniej kontroli substancji dopingowych u sportowców.

Metoda SPME umożliwiła również ekstrakcję szeregu antybiotyków z osocza ludzkiego, dostarczając czułą i selektywną procedurę analityczną w celu określenia farmakokinetyki tych leków. Przykładem jest zoptymalizowana metoda SPME do izolacji amoksycyliny, którą użyto do analizy próbek pacjentów z klinicznie zdiagnozowaną infekcją bakteryjną [30]. Technika SPME była także wykorzystywana do ekstrakcji leków stosowanych w chorobach układu sercowo-naczyniowego oraz w terapii bólu. W badaniach farmakokinetycznych metoprolol and propranolol analizowano w próbkach krwi, a śladowe ilości ibuprofenu and kwasu mefanemowego udało się wyizolować i oznaczyć z próbek moczu i krwi [31, 32]. Ekstrakcja przy użyciu SPME posłużyła również do analizy śladowych ilości sześciu niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) (kwas acetylosalicylowy, kwas mefanemowy, naproksen, piroksykam, diklofenak, indometacyna) w próbkach włosów [33]. Zaproponowana metoda umożliwia analizę wybranych leków nawet kilka miesięcy po zaprzestaniu ich spożycia i może być alternatywą w badaniach toksykologicznych.

Ponadto SPME znalazła również zastosowanie w badaniach leków *in vivo* na żywym organizmie. Dzięki zastosowaniu bardzo cienkich i biokompatybilnych włókien SPME, możliwa była ekstrakcja leków z tkanek stałych podczas zabiegu

operacyjnego. W ten sposób wyizolowano i oznaczono metylprednizolon i jego metabolity w wątrobie [34], a także opracowano metodę umożliwiającą kontrolę poziomu i dystrybucji tkankowej dokso-rubicyny w płucach [18]. Użycie włókien SPME sprawia, że technika ta jest minimalnie inwazyjna dla organizmu. Opracowana metoda mikroekstrakcji w warunkach *in vivo* została już z sukcesem zastosowana do analizy poziomu leku podanego bezpośrednio do płuc świni podczas zabiegu chirurgicznego, a w niedalekiej przyszłości SPME będzie elementem badań klinicznych, umożliwiając monitorowanie stężenia i biodystrybucji dokso-rubicyny podczas nowatorskiej techniki podawania chemioterapeutyku bezpośrednio do płuc pacjenta z zaawansowanym nowotworem płuc.

Oznaczanie leków za pomocą metod instrumentalnych

Jak wspomniano wcześniej, ekstrakcja substancji leczniczych z wybranego materiału biologicznego, a następnie właściwa ich analiza jest procesem złożonym, wymagającym zastosowania odpowiednio czułych metod i urządzeń, które umożliwią oznaczenie nie tylko jakościowe, ale również ilościowe badanych związków. Współcześnie najczęściej stosowanymi metodami laboratoryjnymi do

Rycina 2.
Szczotka SPME
umożliwiająca
jednoczesną
analizę 96 próbek

Rycina 3. Schemat analizy SPME w połączeniu z LC-MS/MS dla wybranych leków przeciwpsychotycznych wyekstrahowanych z różnych matryc biologicznych

oznaczania związków egzo- i endogennych są techniki separacyjne, w tym techniki chromatograficzne i elektroforetyczne [35, 36]. Jedną z najczęściej stosowanych metod analizy próbek biologicznych jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) sprzężona ze spektrometrią mas, z promieniowaniem ultrafioletowym, z fluorymetrią lub z technikami elektrochemicznymi. HPLC posiada wiele zalet – jest techniką o wysokiej czułości, specyficzności oraz umożliwia jednocześnie oznaczanie kilkunastu analitów w jednej próbce. Metodą ilościowego oznaczania leków w matrycach biologicznych, którą zainteresowanie wzrasta w ostatnich latach jest chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas (ang. *liquid chromatography tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS) (**rycina 3**). Ta zaawansowana metoda wykorzystująca wysoce czułe instrumenty analityczne umożliwia oznaczenie nawet śladowych ilości (pikogramy) leków wyizolowanych z różnych materiałów biologicznych. Inną metodą instrumentalną, która także służy do analizy leków jest chromatografia gazowa, która również może być połączona z detektorem mas (ang. *gas-chromatography mass spectrometry*, GC-MS). Metoda ta, podobnie jak wyżej wymienione, umożliwia określenie subterapeutycznych, terapeutycznych i toksycznych poziomów leków w próbkach biologicznych. Każda metoda instrumentalna do analizy leków, która ma być wdrożona do rutynowych badań laboratoryjnych musi spełnić szereg wymagań i wytycznych, dotyczących m.in. liniowości, selektywności, dokładności oraz precyzji, określonych przez amerykańską Agencję Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*, FDA) i/lub Europejską Agencję Leków (ang. *European Medicines Agency*, EMA).

Podsumowanie

Wiedza na temat stężenia danego leku i jego dystrybucji w organizmie niezbędna jest w badaniach farmakologicznych, toksykologicznych, a także w fazie przedklinicznej i klinicznej badań

nad nowymi lekami. Szybka i łatwa kontrola stężenia leku w organizmie umożliwia dostosowanie terapii farmakologicznej dla danego pacjenta oraz zapobiega występowaniu działań niepożądanych leków. Możliwość szybkiego oznaczenia stężenia danego leku w pobranej próbce biologicznej ma zatem istotne znaczenie nie tylko dla badaczy opracowujących nowoczesne metody analityczne, ale również dla personelu medycznego, gdyż umożliwia ona kontrolę farmakoterapii.

Technika SPME dzięki dostępności wielu sorbentów i formatów umożliwia szybką i prostą ekstrakcję związków występujących nawet w śladowych ilościach w różnych matrycach biologicznych. Na szczególną uwagę zasługuje zastosowanie SPME w analizie leków w analizie *in vivo*, jako że biokompatybilne sorbenty mogą być zastosowane bezpośrednio do ekstrakcji leków z krwi lub z tkanek stałych. Dodatkowo, SPME upraszcza etap przygotowania próbki, eliminując potrzebę pobrania krwi lub biopsji tkanki, co jest szczególnie ważne w badaniach biomedycznych, w których wymagany jest pobór dużej liczby próbek. Technika ta może być używana do analizy leków wykorzystując HS-SPME lub DI-SPME oraz być w połączeniu z metodami instrumentalnymi takimi jak GC-MS czy LC-MS. SPME jest obiecującym narzędziem do klinicznego i farmaceutycznego podejścia w personalizowanej medycynie, co w znacznym stopniu może poprawić skuteczności farmakoterapii. Te zalety czynią SPME atrakcyjną opcją do zastosowania w przyszłości w rutynowych analizach laboratoryjnych [25].

Otrzymano: 2018.11.22 · Zaakceptowano: 2018.12.15

Piśmiennictwo

1. Chamberlain J.: The Analysis of Drugs in Biological Fluids, Second Edition. 2018.
2. Raju K.S.R., Taneja I., Singh S.P.: Wahajuddin, Utility of noninvasive biomatrices in pharmacokinetic studies. *Biomed. Chromatogr.* 2013, 1354–1366.
3. Padriani R.: Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Direct Oral Anticoagulants in Patients with Renal Failure. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2018 DOI:10.1007/s13318-018-0501-y.

4. Thevis M., Geyer H., Tretzel L., Schanzer, W.: Sports drug testing using complementary matrices: Advantages and limitations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 220–230.
5. Wilhelm A.J., den Burger J.C.G., Swart E. L.: Therapeutic Drug Monitoring by Dried Blood Spot: Progress to Date and Future Directions. *Clin. Pharmacokinet.* 2014, 961–973.
6. Gröschl, M.: Saliva: A reliable sample matrix in bioanalytics. *Bioanalysis* 2017, DOI: 655–668.
7. Trefz P., Kamysek S., Fuchs P., Sukul P., Schubert J.K., Miekisch W.: Drug detection in breath: Non-invasive assessment of illicit or pharmaceutical drugs. *J. Breath Res.* 2017, 024001.
8. van den Elsen S.H.J., Oostenbrink L.M., Heysell S.K., Hira D., Touw D. J., Akkerman O.W., Bolhuis M.S., Alffenaar J.-W.C.: A Systematic Review Of Salivary Versus Blood Concentrations Of Anti-Tuberculosis Drugs And Their Potential For Salivary Therapeutic Drug Monitoring. *Ther. Drug Monit.* 2017, 17–37.
9. Anizan S., Huestis M.A.: The potential role of oral fluid in antidoping testing. *Clin. Chem.* 2014, 307–322.
10. Fisichella M., Morini L., Sempio C., Groppi A.: Validation of a multi-analyte LC-MS/MS method for screening and quantification of 87 psychoactive drugs and their metabolites in hair. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014, 3497–3506.
11. Montesano C., Johansen S.S., Nielsen M.K.K.: Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC-MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2014, 295–306.
12. Petruczyński A., Waksmundzka-Hajnos M.: Analysis of basic psychotropic drugs in biological fluids & tissues by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Acta Pol. Pharm. – Drug Res.* 2017, 331–346.
13. Millership J.S.: Microassay of drugs and modern measurement techniques. *Paediatr. Anaesth.* 2011, 197–205.
14. Kataoka H.: SPME techniques for biomedical analysis. *Bioanalysis* 2015, 7, 2135–2144.
15. Sarafraz-Yazdi A., Amiri A.: Liquid-phase microextraction. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 2010, 1–14.
16. Tang S., Qi T., Ansah P.D., Nalouzebi Fouemina J.C., Shen W., Basheer C., Lee H.K.: Single-Drop Microextraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* 2018, 306–313.
17. Konieczna L., Roszkowska A., Niedźwiecki M., Bączek T.: Hydrophilic interaction chromatography combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a preconcentration tool for the simultaneous determination of the panel of underivatized neurotransmitters in human urine samples. *J. Chromatogr. A* 2016, 1431, 111–121.
18. Roszkowska A., Tascon M., Bojko B., Goryński K., dos Santos P.R., Cypel M., Pawliszyn J.: Equilibrium ex vivo calibration of homogenized tissue for in vivo SPME quantitation of doxorubicin in lung tissue. *Talanta* 2018, 183, 304–310.
19. Konieczna L., Roszkowska A., Synakiewicz A., Stachowicz-Stencel T., Adamkiewicz-Drożyńska E., Bączek T.: Analytical approach to determining human biogenic amines and their metabolites using eVol microextraction in packed syringe coupled to liquid chromatography mass spectrometry method with hydrophilic interaction chromatography column. *Talanta* 2016, 150, 331–339.
20. Pawliszyn J.: Handbook of Solid-Phase Microextraction. Industry Press, Beijing 2009.
21. Gionfriddo E., Souza-Silva É.A., Pawliszyn J.: Headspace versus Direct Immersion Solid Phase Microextraction in Complex Matrixes: Investigation of Analyte Behavior in Multicomponent Mixtures. *Anal. Chem.* 2015, 8448–8456.
22. Souza-Silva É.A., Gionfriddo E., Pawliszyn J., Jiang R., Rodríguez-Lafuente A., Gionfriddo E., Pawliszyn J., Reyes-garcés N., Gómez-ríos G.A., Boyaci E.: Trends in Analytical Chemistry A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. *Trends Anal. Chem.* 2015, 224–235.
23. De Grazia S., Gionfriddo E., Pawliszyn J.: A new and efficient Solid Phase Microextraction approach for analysis of high fat content food samples using a matrix-compatible coating. *Talanta* 2017, 754–760.
24. Bojko B., Goryński K., Gomez-Rios G.A., Knaak J.M., Machuca T., Cudjoe E., Spetzler V.N., Hsin M., Cypel M., Selzner M., Liu M., Keshjavee S., Pawliszyn J.: Low invasive in vivo tissue sampling for monitoring biomarkers and drugs during surgery. *Lab. Invest.* 2014, 94, 586–594.
25. Roszkowska A., Miękus N., Bączek T.: Application of solid-phase microextraction in current biomedical research., *J Sep Sci.* 2018, DOI: 10.1002/jssc.201800785
26. Fucci N., Gambelunghe C., Aroni K., Rossi R.: A direct immersion solid-phase microextraction gas chromatography/mass spectrometry method for the simultaneous detection of levamisole and minor cocaine congeners in hair samples from chronic abusers. *Ther. Drug Monit.* 2014, 36, 789–795.
27. Gambelunghe C., Rossi R., Aroni K., Gili A., Bacci M., Pascal, V., Fucci N.: Norcocaine and cocaethylene distribution patterns in hair samples from light, moderate, and heavy cocaine users. *Drug Test. Anal.* 2017, 9, 161–167.
28. Gentili S., Mortali C., Mastrobattista L., Berretta P., Zaami S.: Determination of different recreational drugs in sweat by headspace solid-phase microextraction gas chromatography mass spectrometry (HS-SPME GC/MS): Application to drugged drivers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2016, 129, 282–287.
29. Boyaci E., Goryński K., Rodríguez-Lafuente A., Bojko B., Pawliszyn J.: Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. *Anal. Chim. Acta* 2014, 809, 69–81.
30. Szultka M., Krzeminski R., Walczak J., Jackowski M., Buszewski B.: Pharmacokinetic study of amoxicillin in human plasma by solid-phase microextraction followed by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.* 2014, 28, 255–264.
31. Abedi H.: Ebrahimzadeh, H., Electromembrane-surrounded solid-phase microextraction coupled to ion mobility spectrometry for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs: A rapid screening method in complicated matrices. *J. Sep. Sci.* 2015, 38, 1358–1364.
32. Ahmad S., Tucker M., Spooner N., Murnane D., Gerhard U.: Direct ionization of solid-phase microextraction fibers for quantitative drug bioanalysis: From peripheral circulation to mass spectrometry detection. *Anal. Chem.* 2015, 87, 754–759.
33. Es'haghi Z., Esmaeili-Shahri E.: Sol-gel-derived magnetic SiO₂/TiO₂ nanocomposite reinforced hollow fiber-solid phase microextraction for enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human hair prior to high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2014, 973, 142–151.
34. Bojko B., Reyes-Garcés N., Bessonneau V., Goryński K., Mousavi F., Souza Silva E.A., Pawliszyn J.: Solid-phase microextraction in metabolomics. *TrAC – Trends Anal. Chem.* 2014, 61, 168–180.
35. Adaway J.E., Keevil B.G., Owen L.J.: Liquid chromatography tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Ann. Clin. Biochem.* 2015, 18–38.
36. Phillips T.M.: Recent advances in CE and microchip-CE in clinical applications: 2014 to mid-2017. *Electrophoresis* 2018, 126–135.