

## Oznaczanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych w surowicy ludzkiej techniką GC/MS: optymalizacja procedury ekstrakcyjnej leków\*

GC/MS determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human serum: an optimization of the drug extraction procedure

Sławomir Kurkiewicz, Anna Dzierżęga-Lęcznar, Krystyna Stępień

### STRESZCZENIE

Oznaczanie niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) w płynach fizjologicznych ludzi i zwierząt wymaga zastosowania szybkich i wydajnych procedur izolacji tych leków z biologicznej matrycy. Celem pracy było porównanie różnych metod ekstrakcji NLPZ z surowicy ludzkiej, jako etapu poprzedzającego analizę tych leków techniką GC/MS. W badaniach wykorzystano dostępną handlowo surowicę stosowaną jako materiał kontrolny w oznaczeniach biochemicznych, do której dodano ibuprofen, paracetamol, flurbiprofen, nabumeton, naproksen, ketoprofen, kwas mefenamowy oraz sól sodową diklofenaku. W celu wyizolowania NLPZ z surowicy zastosowano ekstrakcję do fazy stałej, technikę HybridSPE-PPT oraz ekstrakcję ciecz-ciecz. Leki poddano derywatywacji do pochodnych trimetylosililowych za pomocą BSTFA, a następnie analizowano techniką GC/MS. Najwyższą wydajność ekstrakcji oraz najlepszy stopień oddzielenia NLPZ od endogennych składników surowicy uzyskano metodą ekstrakcji do fazy stałej w postaci żelu krzemionkowego z aktywnymi grupami oktadecylowymi.

### ADRES

#### DO KORESPONDENCJI:

Dr n. farm. Sławomir Kurkiewicz  
Katedra Analizy Instrumentalnej  
Wydziału Farmaceutycznego  
z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej  
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego  
w Katowicach  
ul. Narcyzów 1  
41-200 Sosnowiec  
tel. 32 364 10 53  
e-mail: slawek@sum.edu.pl

### SŁOWA KLUCZOWE

GC/MS, sililacja, ekstrakcja do fazy stałej, NLPZ

### ABSTRACT

Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in human and animal physiological fluids requires the use of appropriate pro-

\* Badania finansowane przez Śląski Uniwersytet Medyczny w Katowicach (grant nr KNW-2-111/10).

cedures permitting rapid and efficient recovery of the drugs from biological matrices. The aim of this study was to compare various methods of NSAIDs extraction from human serum that is essential for GC/MS analysis of the drugs. Commercially available biochemistry control human serum supplemented with ibuprofen, paracetamol, flurbiprofen, nabumeton, naproxen, ketoprofen, mefenamic acid and diclofenac sodium salt was used. Solid phase extraction, HybridSPE-PPT technology and liquid-liquid extraction were applied for NSAIDs isolation from the serum. GC/MS analysis of the drugs was preceded by their derivatization to trimethylsilyl esters with BSTFA. The highest extraction efficiency and the best separation of the drugs from endogenous components of the serum were achieved using the solid phase extraction on octadecyl-bonded silica.

**KEY WORDS**

GC/MS, silylation, SPE, serum, NSAIDs

**WSTĘP**

Rozwój badań zmierzających do opracowania szybkich, wydajnych i czułych metod oznaczenia niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) związany jest z ogromną popularnością tej grupy farmaceutyków, z których większość jest sprzedawana bez recepty. Chociaż NLPZ są uznawane za bezpieczne, ich przedawkowanie lub przewlekłe stosowanie może prowadzić do poważnych efektów ubocznych. Poza względami klinicznymi oraz toksykologicznymi oznaczanie stężenia NLPZ w płynach fizjologicznych stało się istotne także w medycynie sądowej oraz weterynarii [1,2], w tym w kontroli antydopingowej zwierząt biorących udział w wyścigach [3,4,5]. Oznaczanie NLPZ w osoczu, surowicy lub moczu ludzi i zwierząt wymaga zastosowania szybkich i wydajnych procedur izolacji tych leków z biologicznej matrycy [6,7,8]. Najczęściej stosuje się w tym celu ekstrakcję do fazy stałej SPE [9], mikroekstrakcję do fazy stałej SPME lub ciekłej LPME [10] oraz ekstrakcję ciecz-ciecz LLE [11]. Celem niniejszej pracy było porównanie różnych metod ekstrakcji NLPZ z surowicy ludzkiej, jako etapu poprzedzającego analizę jakościową i ilościową tych leków techniką GC/MS.

**MATERIAŁ I METODY**

W badaniach wykorzystano dostępną handlowo surowicę ludzką stosowaną jako materiał kontrolny w pracowniach biochemicznych laboratoriów analityki medycznej (*Biochemistry control serum I, human*; BioSystems). Do surowicy

do dodano ibuprofen, paracetamol, flurbiprofen, nabumeton, naproksen, ketoprofen, kwas mefenamowy oraz sól sodową diklofenaku (wszystkie produkcji Sigma-Aldrich), otrzymując roztwory, w których stężenie każdego z leków było identyczne i wynosiło: 1, 10, 20, 30 lub 50 ng/μl. W celu wyizolowania NLPZ z surowicy zastosowano ekstrakcję do fazy stałej (SPE), technikę HybridSPE-PPT (łączyącą precipitację białek z usunięciem obecnych w surowicy fosfolipidów na drodze SPE) oraz ekstrakcję ciecz-ciecz (LLE). Wydajność ekstrakcji obliczono na podstawie krzywych kalibracyjnych przygotowanych z wykorzystaniem roztworów oznaczanych NLPZ w metanolu (Fluka).

**EKSTRAKCYJA DO FAZY STAŁEJ (SPE DSC-18)**

Do przeprowadzenia ekstrakcji wykorzystano kolumnienki Discovery® DSC-18 (1 ml, 100 mg; Supelco) i zaopatrzone w pompę zestaw Baker spe-24G (J.T. Baker®). Warunki przeprowadzania procesu oraz dobór rozpuszczalników ustalono na podstawie materiałów referencyjnych producenta dołączonych do zakupionych kolumnienek. Każdą kolumnienkę kondycjonowano z użyciem 1 ml metanolu oraz 1 ml wody dejonizowanej (Barnstead NANOpure), po czym wprowadzano 150 μl roztworu NLPZ w surowicy z dodatkiem 3 μl kwasu fosforowego (Chempur). Próbkę powoli przepuszczano przez kolumnienkę, używając podciśnienia z pompy. Po przeprowadzeniu ekstrakcji kolumnienkę przemywano za pomocą 1 ml 5% wodnego roztworu metanolu, a następnie suszono strumieniem azotu przez 10 minut. Do wymycia analitu użyto 1 ml metanolu, a uzyskany eluat (ekstrakt NLPZ) odparowano do sucha w strumieniu azotu.

**EKSTRAKCYJA TECHNIKĄ HYBRIDSPE-PPT**

Niesteroidowe leki przeciwzapalne izolowano z surowicy z wykorzystaniem kolumnienek HybridSPE™ – Precipitation (30 mg/1 ml SPE Tubes; Supelco). Proces prowadzono zgodnie ze wskazaniem producenta kolumnienek, zamieszczonymi w materiałach referencyjnych [13,14]. Do probówek Eppendorf o pojemności 1,5 ml wprowadzano po 150 µl roztworu NLPZ w surowicy oraz 450 µl 5% roztworu kwasu mrówkowego w acetonitrylu (Sigma-Aldrich). Zawartość probówek wytrząsano przez minutę (worteks), a następnie dwukrotnie wirowano (10 min, 9300 g). Supernatant powoli przesączano przez kolumnkę przy użyciu zestawu Baker spe-24G. Zebrany w fiolkach eluat zawierający NLPZ odparowano do sucha w strumieniu azotu.

**EKSTRAKCYJA CIECZ-CIECZ ZA POMOCĄ ETERU DIETYLOWEGO (LLE-E)**

Ekstrakcję ciecz-ciecz prowadzono zgodnie z metodyką opracowaną przez Gonzaleza i wsp. [11]. W probówkach Eppendorf o pojemności 1,5 ml zmieszano 250 µl roztworu NLPZ w surowicy oraz 250 µl wody dejonizowanej, a następnie dodano 50 µl 1 M HCl w celu doprowadzenia pH do wartości 2–3. Zawartość probówek mieszano przez 10 sekund (worteks). Następnie przeprowadzono ekstrakcję z użyciem trzech porcji po 700 µl eteru dietylowego. Za każdym razem próbkę wraz z eterem dietylowym wytrząsano przez 2 minuty (worteks), po czym wirowano (15 min, 9300 g). Do połączonych faz organicznych wprowadzono 30–35 mg mieszaniny buforującej złożonej z węgla i wodorowęglanu sodu (2 : 1 w/w; Chempur). Całość ponownie mieszano na worteksie przez 2 minuty. Eterowy ekstrakt NLPZ po zdekantowaniu odparowano do sucha w strumieniu azotu.

**DERYWATYZACJA NLPZ**

W celu otrzymania trimetylosililowych pochodnych analizowanych NLPZ jako odczynnik derywatyzujący zastosowano N,O-bis-(trimetylosililo)trifluoroacetamid (BSTFA, Supelco). Sililację NLPZ prowadzono w sposób opisany wcześniej [12]. Do ekstraktów pozostałych w fiolkach po odparowaniu rozpuszczalników wprowadzano po 150 µl BSTFA i po kilkusekundowym wytrząsaniu (worteks) zawartość fiolek ogrzewano w temp. 70°C przez 60 min. Po schłodzeniu otrzymane próbki poddano analizie techniką GC/MS.

**WARUNKI ANALIZY GC/MS**

Analizy GC/MS wykonano stosując chromatograf gazowy Agilent serii 6890 sprzężony ze spektrometrem mas Agilent Network 5973 i automatycznym podajnikiem próbek 7683 firmy Agilent Technologies. Wykorzystano dozownik typu „zimnego dozowania na kolumnę” (COC) z elektroniczną kontrolą ciśnienia, którego temperatura w trybie pracy *Track Oven* była o 3°C wyższa od temperatury pieca chromatograficznego. Temperatura zastosowanej kolumny kapilarnej J&W HP5-MS (60 m x 0,32 mm x 0,25 µm) wynosiła początkowo 40°C i utrzymywana była przez 1 min, a następnie wzrastała z prędkością 20°C/min do 160°C i dalej z prędkością 5°C/min do 205°C, które utrzymywano przez 10 min, po czym zwiększano do 270°C z prędkością 3°C/min. Jako gaz nośny zastosowano hel o szybkości przepływu 2,6 ml/min. Temperatura linii transferowej wprowadzającej kolumnę chromatograficzną bezpośrednio do źródła jonów spektrometru mas wynosiła 250°C. Zastosowano standardową wartość energii jonizacji (70eV).

Podczas pracy spektrometru mas w trybie zbierania pełnego widma (*full scan*) monitorowano jony o wartości m/z od 70 do 420. Na podstawie zarejestrowanych widm oznaczanych leków wybrano charakterystyczne jony, które poddano analizie w trybie SIM (monitorowania wybranych jonów). Były to jony o następujących wartościach m/z: 73, 117, 160, 234, 263 i 278 dla estru trimetylosililowego ibuprofenu; 73, 206, 280 i 295 dla pochodnej di-trimetylosililowej paracetamolu; 73, 166, 181, 208 i 223 dla pochodnej mono-O-trimetylosililowej paracetamolu; 73, 165, 180, 198, 301 i 316 dla estru trimetylosililowego flurbiprofenu; 128, 171, 185 i 228 dla nabumetonu; 73, 141, 185, 243, 287 i 302 dla estru trimetylosililowego naproksenu; 73, 105, 282, 295 i 311 dla estru trimetylosililowego ketoprofenu; 73, 180, 194, 208, 223, 298 i 313 dla estru trimetylosililowego kwasu mefenamowego oraz 73, 214, 216, 242, 252, 254, 269, 277, 279, 367 i 369 dla estru trimetylosililowego diklofenaku.

**WYNIKI I DISKUSJA**

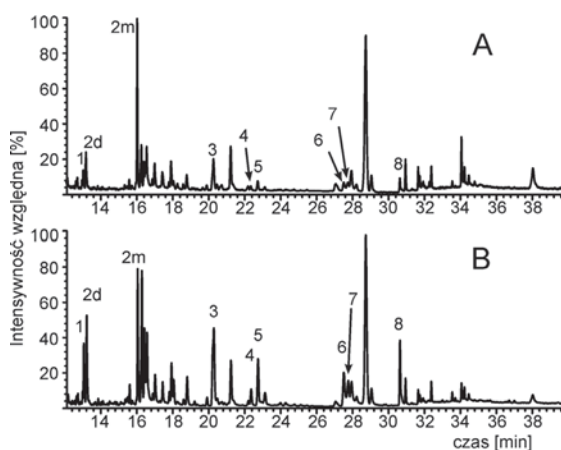
W niniejszej pracy do wyizolowania analizowanych NLPZ z modelowej surowicy ludzkiej

zastosowano trzy odmienne techniki: ekstrakcję do fazy stałej z wykorzystaniem sorbentu DSC-18, technikę HybridSPE-PPT z wykorzystaniem fazy stacjonarnej w postaci żelu krzemionkowego opłaszczzonego cyrkonem oraz ekstrakcję ciecz-ciecz za pomocą eteru dietylowego. W wyniku derywatywacji uzyskanych ekstraktów za pomocą BSTFA leki posiadające grupę karboksylową, a więc: ibuprofen, flurbiprofen, naproksen, kwas mefenamowy, ketoprofen oraz diklofenak, zostały przekształcone w estry trimetylosililowe. Z uwagi na specyficzną budowę cząsteczki, paracetamol może ulegać derywatywacji w dwóch miejscach: przy atomie tlenu grupy wodorotlenowej oraz przy atomie azotu grupy amidowej.

W warunkach zastosowanych w niniejszej pracy otrzymano pochodną mono-O-trimetylosililową paracetamolu o charakterze eteru oraz pochodną di-trimetylosililową leku. W analizie ilościowej uwzględniono sumę obu pochodnych. Spośród ośmiu analizowanych

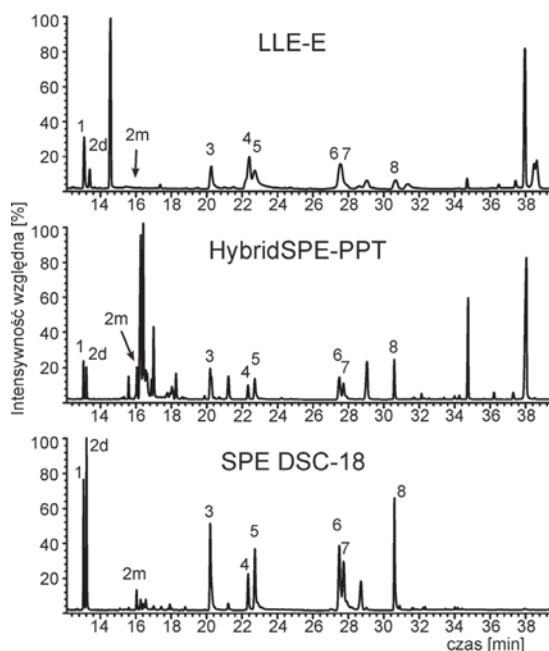
leków jedynie nabumeton, zgodnie z oczekiwaniem, nie uległ derywatywacji ze względu na brak aktywnych atomów wodoru w jego cząsteczce. Mimo odmiennego charakteru chemicznego lek ten został włączony do badań w celu sprawdzenia, czy można go oznaczyć w przyjętych warunkach eksperymentu wraz z lekami, z którymi może współwystępować w próbkach biologicznych.

W analizie leków techniką GC/MS tryb *full scan* (zbierania pełnego widma) często jest zastępowany trybem monitorowania wybranych jonów (SIM) [11,15,16]. Strategię taką zastosowano również w niniejszej pracy. Tryb SIM charakteryzuje się lepszym stosunkiem sygnału do szumu, co przy próbkach pochodzenia biologicznego pozwala na etapie rejestracji wzmocnić sygnał pochodzący od analizowanych związków, przy jednoczesnym wytłumieniu tła. W przypadku izolacji NPLZ z surowicy krwi jest to istotne, gdyż ekstrakcja nie gwarantuje całkowitego oddzielenia analizowanych leków od matrycy. Jak wynika z przykładowych danych przedstawionych na rycinie 1,



**Ryc. 1.** Porównanie rozdzielności chromatograficznych mieszaniny NLPZ poddanych silylacji po ekstrakcji z surowicy (roztwór o stężeniu 1 ng/ $\mu$ l) do fazy stałej DSC-18 w trybie zbierania pełnego widma (A) oraz w trybie monitorowania wybranych jonów (B). Oznaczenia pików: 1 – ester trimetylosililowy ibuprofenu, 2d – pochodna di-trimetylosililowa paracetamolu, 2m – pochodna mono-O-trimetylosililowa paracetamolu, 3 – ester trimetylosililowy flurbiprofenu, 4 – nabumeton, 5 – ester trimetylosililowy naproksenu, 6 – ester trimetylosililowy ketoprofenu, 7 – ester trimetylosililowy kwasu mefenamowego, 8 – ester trimetylosililowy diklofenaku.

**Fig. 1.** Comparison of the chromatograms of NSAID mixture (1 ng/ $\mu$ l) silylated after the solid phase (DSC-18) extraction from serum, obtained in a full scan (A) and selected ion monitoring (B) modes. Peak designation: 1 – trimethylsilyl ester of ibuprofen, 2d – di-trimethylsilyl derivative of paracetamol, 2m – mono-O-trimethylsilyl derivative of paracetamol, 3 – trimethylsilyl ester of flurbiprofen, 4 – nabumeton, 5 – trimethylsilyl ester of naproxen, 6 – trimethylsilyl ester of ketoprofen, 7 – trimethylsilyl ester of mefenamic acid, 8 – trimethylsilyl ester of diclofenac.



**Ryc. 2.** Porównanie rozdzielności chromatograficznych mieszaniny NLPZ (10 ng/ $\mu$ l) poddanych silylacji po wyizolowaniu z surowicy techniką ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE-E), HybridSPE-PPT oraz ekstrakcji do fazy stałej (SPE DSC-18). Oznaczenia pików jak na ryc. 1.

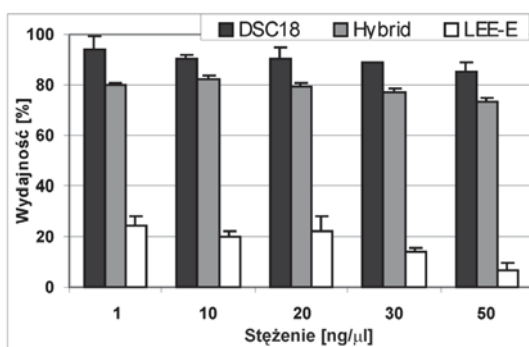
**Fig. 2.** Comparison of the chromatograms of NSAID mixture (10 ng/ $\mu$ l) silylated after drug isolation from serum using liquid-liquid extraction (LLE-E), HybridSPE-PPT, and solid phase extraction (SPE DSC-18). For peak designation: see fig. 1.



zastosowanie trybu SIM rzeczywiście pozwoliło na zwiększenie czułości metody.

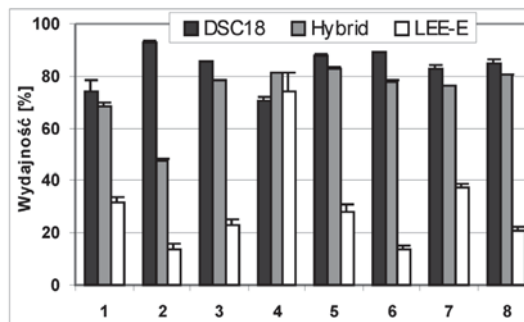
Na rycinie 2 porównano rozdziały chromatograficzne mieszaniny NLPZ poddanych silicacji po wyekstrahowaniu z surowicy metodami LLE-E, HybridSPE-PPT oraz SPE DSC-18. Oprócz analizowanych leków, na chromatogramach obecne są również piki odpowiadające trimetylosililowym pochodnym węglowodanów oraz lipidów pochodzących z surowicy krwi. Zidentyfikowano m.in. kwas heksadecanowy (czas retencji 21,3 min), kwas oktadecenowy (28,0 min), kwas oktadecanowy (29,2 min) oraz kwas arachidonowy (31,7 min). Na chromatogramach uzyskanych po ekstrakcji ciecz-ciecz wykryto ponadto trimetylosililową pochodną 2,6-di-tert-butyl-o-p-krezolu o czasie retencji 14,3 min. Związek ten dodawany jest do eteru dietylowego w ilości 0,0005%, w celu jego stabilizacji. Poza tym we wszystkich próbkach, bez względu na rodzaj zastosowanej procedury ekstrakcyjnej, stwierdzono obecność innych, trudnych do zidentyfikowania związków.

Rycina 3 ilustruje porównanie wydajności zastosowanych metod ekstrakcji na przykładzie ketoprofenu w pełnym zakresie oznaczanych stężeń, a rycina 4 dla wszystkich oznaczanych NLPZ o stężeniu 30 ng/μl. Z otrzymanych danych wynika, iż najwyższe wartości odzysku leków wystąpiły przy zastosowaniu techniki SPE DSC-18. Wśród leków ekstrahowanych tą metodą najlepsze wyniki otrzymano dla pochodnych paracetamolu (89–99% zależnie od stężenia leku), flurbiprofenu (79–103%) oraz ketoprofenu (85–94%). Najniższe wydajności



**Ryc. 3.** Wydajność ekstrakcji ketoprofenu z surowicy techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE DSC-18), HybridSPE-PPT oraz ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE-E) dla różnych stężeń leku.

**Fig. 3.** The efficiency of solid phase extraction (SPE DSC-18), HybridSPE-PPT, and liquid-liquid extraction (LLE-E) of ketoprofen from serum at various drug concentrations.



**Ryc. 4.** Porównanie wydajności ekstrakcji analizowanych NLPZ z surowicy krwi techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE DSC-18), HybridSPE-PPT oraz ekstrakcji ciecz-ciecz (LLE-E). Stężenie każdego leku w surowicy: 30 ng/μl. Oznaczenia leków: 1 – ibuprofen, 2 – paracetamol, 3 – flurbiprofen, 4 – nabumeton, 5 – naproksen, 6 – ketoprofen, 7 – kwas mefenamowy, 8 – diklofenak.

**Fig. 4.** Comparison of the extraction efficiency of the analyzed NSAIDs from serum with the use of solid phase extraction (SPE DSC-18), HybridSPE-PPT, and liquid-liquid extraction (LLE-E). Each drug concentration in serum: 30 ng/μl. Drug designation: 1 – ibuprofen, 2 – paracetamol, 3 – flurbiprofen, 4 – nabumeton, 5 – naproxen, 6 – ketoprofen, 7 – mefenamic acid, 8 – diclofenac.

ekstrakcji SPE stwierdzono dla nabumetonu (70–87%) oraz pochodnych ibuprofenu (57–82%). W metodzie tej wykorzystano kolumnienki ekstrakcyjne Discovery® DSC-18 z fazą odwróconą w postaci żelu krzemionkowego z aktywnymi grupami oktadecylowymi.

Analogicznych wypełnień (C18 Bond-Elut) użyli Bakkali i wsp. do oznaczania diklofenaku, indometacyny i fenylobutazonu w moczu [17]. W tym przypadku próbki przed ekstrakcją doprowadzono do pH 5, a ekstrakty analizowano za pomocą HPLC. Odzyski diklofenaku ukształtowały się na zbliżonym poziomie 85% przy stężeniach w moczu 0,02–0,1 ng/μl. Także Ternes [18] wykorzystał fazy odwrócone C18 do oznaczania farmaceutyków o właściwościach kwasowych w próbkach wody, z tą różnicą, że przed ekstrakcją próbki były doprowadzane do pH 2. Uzyskane przez niego wydajności ekstrakcji dla naproksenu, ketoprofenu, diklofenaku i ibuprofenu oscyływały w granicach 71–98%.

Z danych otrzymanych w przeprowadzonym eksperymencie wynika, że procedura HybridSPE-PPT w porównaniu z SPE DSC-18 jest metodą mniej efektywną dla wszystkich analizowanych leków poza nabumetonem, dla którego odzyski ukształtowały się na poziomie 77–102%, czyli niewiele wyższym niż w metodzie SPE DSC-18. Fakt ten może być związany z odmiennymi od pozostałych leków właściwościami cząsteczki

nabumetonu, który jest prolekiem o strukturze ketonu, pozbawionym właściwości kwasowych. Uśrednione wydajności dla poszczególnych leków izolowanych techniką HybridSPE-PPT zawierały się w przedziale 47–92%.

Niskie odzyski leków, znaczny rozrzut ich wartości (7–92%) oraz niezadowalającą powtarzalność wyników otrzymano w metodzie LLE-E. Podobne warunki eksperymentu zastosowali Gonzalez i wsp. [11] w analizie siedemnastu NLPZ w osoczu i moczu końskim. Różnica polegała na metylacji NLPZ za pomocą jodku metylu w acetonie w obecności węglanu potasu. Uzyskane przez cytowanych autorów wydajności ekstrakcji leków z moczu wynosiły od 38% (ketoprofen) do 84% (propyfenazon), natomiast podczas ekstrakcji z osocza od 23% (kwas mefenamowy) do 100% (ibuproksam).

## WNIOSKI

1. Wszystkie zastosowane techniki ekstrakcji umożliwiają wyizolowanie ibuprofenu, paracetamolu, flurbiprofenu, nabumetonu, naproksenu, ketoprofenu, kwasu mefenamowego oraz diklofenaku z surowicy krwi.
2. Najlepszy stopień oddzielenia NLPZ od endogennych składników surowicy uzyskano metodą SPE z wykorzystaniem sorbentu DSC-18.
3. Z wyjątkiem nabumetonu, ekstrakcja pozostałych leków do tej fazy charakteryzuje się większą wydajnością i powtarzalnością w porównaniu z procedurą HybridSPE-PPT oraz ekstrakcją ciec-ciecz za pomocą eteru dietylowego.

## PIŚMIENNICTWO

1. Takeda A., Tanaka H., Shinohara T., Ohtake I. Systematic analysis of acid, neutral and basic drugs in horse plasma by combination of solid-phase extraction, non-aqueous partitioning and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 2001; 758: 235–248.
2. Musshoff F., Stamer U.M., Madea B. Pharmacogenetics and forensic toxicology. *Forensic. Sci. Int.* 2010; 203: 53–62.
3. van Eenoo P., Delbeke F.T., Roels K., Baert K., Detection and disposition of tolmetin in the horse. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003; 31: 723–730.
4. Peters R.J.B., Stolker A.A.M., Mol J.G.B., Screening in veterinary drug analysis and sports doping control based on full-scan, accurate-mass spectrometry. *Trends. Anal. Chem.* 2010; 29: 1250–1268.
5. Yu N.H., Ho E.N., Tang F.P., Wan T.S., Wong A.S. Comprehensive screening of acidic and neutral drugs in equine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2008; 1189: 426–434.
6. Cruz-Vera M., Lucena R., Cardenas S., Varearel M. Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: Application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples. *J. Chromatogr. A.* 2008; 1202: 1–7.
7. Ibrahim H., Boyer A., Bonajila C., Couderc F., Nepveu F. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pharmaceuticals and human serum by dual-mode gradient HPLC and fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 2007; 857: 59–66.
8. de Oliveira A.R.M., Cesarino E.J., Bonato P.S. Solid-phase microextraction and chiral HPLC analysis of ibuprofen in urine. *J. Chromatogr. B.* 2005; 818: 285–291.
9. Starek M., Krzek J. A review of analytical techniques for determination of oxicams, nimesulide and nabumetone. *Talanta* 2009; 77: 925–942.
10. Pavlovic D.M., Babic S., Horvat A.J.M., Kastelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC-Trend Anal. Chem.* 2007; 26: 1062–1075.
11. Gonzalez G., Ventura R., Smith A.K., de la Torre A.K., Segura J. Detection of non-steroidal anti-inflammatory drugs in equine plasma and urine by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 1996; 719: 251–264.
12. Kurkiewicz S., Dzierżęga-Lęcznar A., Stepień K. Porównanie skuteczności czynników silanizujących w analizie niesteroidowych leków przeciwzapalnych techniką GC/MS. *Farm. Przegł. Nauk.* 2010; 7: 28–32.
13. Aurand C., Trinh A., Ye M., M i C. Introducing HybridSPE™ – Precipitation technology for pharmaceutical bioanalytical sample preparation. *Supelco Reporter* 2008; 33: 7–10.
14. Aurand C., Mi C., Lu X., Trinh A., Ye M. Troubleshooting analyte recovery when using HybridSPE-Precipitation Technology. *Supelco Reporter* 2009; 27.2: 17–19.
15. Kim K.R., Yoon H.R. Rapid screening for acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by gas chromatography-mass spectrometry in the selected-ion monitoring mode. *J. Chromatogr. B.* 1996; 682: 55–66.
16. Suenami K., Lim L.W., Takeuchi T., Sasajima Y., Sato K., Takekoshi T., Kanno S. Rapid and simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by LC-MS with solid-phase extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 384: 1501–1505.
17. Bakkali A., Corta E., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F. Study of the solid-phase extraction of diclofenac sodium, indomethacin and phenylbutazone for their analysis in human urine by liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 1999; 729: 139–145.
18. Ternes T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Trends. Anal. Chem.* 2001; 20: 419–434.