

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie

Sekvenční injekční chromatografie

Disertační práce

2006

Mgr. Petr Chocholouš

Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval svému školiteli Doc. RNDr. Petru Solichovi, CSc. za cenné rady, pomoc a hlavně za jeho inspiraci a motivaci během celého mého postgraduálního studia a při přípravě disertační práce.

Dále bych rád poděkoval RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. jehož zkušenosti se SIA a HPLC technikou byly pro mě výborným základem pro rychlou orientaci, ovládnutí přístrojového vybavení a vypracovávání zadaných úkolů.

Chtěl bych upřímně poděkovat všem svým kolegům a spolupracovníkům z katedry analytické chemie za pochopení, vstřícnost a za vynikající pracovní atmosféru, která na tomto pracovišti vládla.

Velký dík patří mé rodině a mým blízkým za jejich podporu, porozumění a trpělivost po celou dobu mého doktorského studia.

Děkuji grantovým agenturám FRVŠ, GA UK a Výzkumným záměrům MŠM za finanční podporu mých výzkumných úkolů a za možnost prezentovat výsledky své práce na domácích i zahraničních konferencích.

V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým přátelům za chvíle absolutní pohody.

Petr Chocholouš

Seznam použitých zkratek

ACN	Acetonitril
BI	Bead Injection (průtoková analýza s využitím mikrosfér sorbentu)
CIM [®]	Convective Interaction Media (monolitické disky firmy BIA Separations)
DAD	Diode Array Detector (detektor s diodovým polem)
FT	Fourrierova transformace
GC	Gas Chromatography (plynová chromatografie)
FIA	Flow Injection Analysis (průtoková injekční analýza)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
LC	Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)
LLE	Liquid-liquid Extracton (extrakce z kapaliny do kapaliny)
LOD	Limit of Detection (limit detekce)
LOQ	Limit of Quantification (limit kvantifikace)
LOV	Lab-On-Valve (speciální nástavec selekčního ventilu v SIA)
SIA	Sequential Injection Analysis (sekvenční injekční analýza)
SIC	Sequential Injection Chromatography (sekvenční injekční chromatografie)
SI-BI-LOV	Sekvenční injekční analýza s LOV pro měření s pomocí BI
SICrom [™]	Accelerated Liquid Chromatography System (komerčně vyráběný chromatografický systém na základě SIA)
SI-LOV	Sekvenční injekční analýza s LOV
SPE	Solid Phase Extraction (extrakce na pevnou fázi)
SPR	Solid Phase Reactor (reaktor s tuhou fází)
UV	Ultra Violet (ultrafialová část spektra)
UV-VIS	Ultra Violet-Visible (ultrafialová a viditelná část spektra)

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ	2
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	3
OBSAH	4
SEZNAM OBRÁZKŮ	6
1. ÚVOD	7
2. CÍL PRÁCE	8
3. TEORETICKÁ ČÁST	9
3.1. PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY	10
3.1.1. Průtoková injekční analýza (FIA)	10
3.1.2. Sekvenční injekční analýza (SIA)	12
3.1.3. Lab-On-Valve (LOV)	14
3.1.4. Bead injection (BI)	16
3.1.5. Porovnání systémů FIA / SIA	18
3.1.6. Detektory v SIA	20
3.2. ÚPRAVA VZORKŮ VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE	21
3.2.1. Přímý nástřík	21
3.2.2. Extrakce z pevné lékové formy do kapaliny	21
3.2.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny – LLE	22
3.2.4. Extrakce na pevnou fázi - SPE	23
3.2.5. ÚPRAVA VZORKU V SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZE	25
3.3. CHROMATOGRAFIE	26
3.3.1. Retenční charakteristiky	26
3.3.2. Účinnost chromatografického systému	28
3.3.3. Selektivita chromatografického systému	31
3.3.4. Ostatní charakteristiky chromatografického procesu	32
3.3.5. Mobilní fáze	33
3.3.6. Vlnová délka detekce	37
3.3.7. Objem nástříku	37
3.3.8. Rozdělení chromatografických metod	39
3.4. MONOLITICKÉ CHROMATOGRAFICKÉ STACIONÁRNÍ FÁZE	41
3.4.1. Komerčně dostupné monolitické kolony	44
3.4.2. Komerčně dostupné monolitické disky	45
3.5. SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRAFIE SIC	46

3.6.	POROVNÁNÍ HPLC A SIC	50
4.	REŠERŠNÍ A EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE	52
4.1.	MONOLITICKÉ KOLONY – NOVÝ KONCEPT SEPARACE V SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZE	53
4.2.	RYCHLÉ SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ NAFAZOLIN NITRÁTU A METHYLPARABENU POMOCÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY	56
4.3.	JEDNODUCHÉ STANOVENÍ BETAMETASONU A CHLORAMFENIKOLU V LÉČIVÉM PŘÍPRAVKU ZA POUŽITÍ KRÁTKÉ MONOLITICKÉ KOLONY ZAPOJENÉ DO SYSTÉMU SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZY	58
4.4.	NOVÁ APLIKACE MONOLITICKÉ KOLONY ONYX™ PRO SIMULTÁNNÍ STANOVENÍ KYSELINY SALICYLOVÉ A TRIAMCINOLON ACETONIDU POMOCÍ SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRFIE	60
4.5.	PŘEHLED SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRFIE A JEJÍ APLIKACE VE FARMACEUTICKÉ ANALÝZE	62
5.	PŘÍLOHY	63
5.1.	PUBLIKOVANÉ ČLÁNKY	64
5.2.	PŘEDNÁŠKY A POSTERY UVEDENÉ VE SBORNÍCÍCH	65
5.3.	PŘÍLOHA I. - D. ŠATÍNSKÝ, P. SOLICH, P. CHOCHOLOUŠ, R. KARLÍČEK: MONOLITHIC COLUMNS - A NEW CONCEPT OF SEPARATION IN THE SEQUENTIAL INJECTION TECHNIQUE, ANAL. CHIM. ACTA 499 (2003) 205 – 214.	67
5.4.	PŘÍLOHA II. - P. CHOCHOLOUŠ, D. ŠATÍNSKÝ, P. SOLICH: FAST SIMULTANEOUS SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF NAPHAZOLINE NITRATE AND METHYLPARABEN BY SEQUENTIAL INJECTION CHROMATOGRAPHY, TALANTA 70 (2006) 408 - 413.	78
5.5.	PŘÍLOHA III. - D. ŠATÍNSKÝ, P. CHOCHOLOUŠ, M. SALABOVÁ, P. SOLICH: SIMPLE DETERMINATION OF BETAMETHASONE AND CHLORAMPHENOCOL IN A PHARMACEUTICAL PREPARATION USING A SHORT MONOLITHIC COLUMN COUPLED TO SEQUENTIAL INJECTION SYSTEM, J. SEP. SCI. 29 (2006) V TISKU.	85
5.6.	PŘÍLOHA IV. - P. CHOCHOLOUŠ, P. HOLÍK, D. ŠATÍNSKÝ, P. SOLICH: A NOVEL APPLICATION OF ONYX™ MONOLITHIC COLUMN FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SALICYLIC ACID AND TRIAMCINOLONE ACETONIDE BY SEQUENTIAL INJECTION CHROMATOGRAPHY, TALANTA ZASLÁNO K TISKU.	92
5.7.	PŘÍLOHA V - P. CHOCHOLOUŠ, P. SOLICH, D. ŠATÍNSKÝ: AN OVERVIEW OF SEQUENTIAL INJECTION CHROMATOGRAPHY AND ITS APPLICATIONS IN PHARMACEUTICAL ANALYSIS, ANAL. CHIM. ACTA ZASLÁNO K TISKU.	104
5.8.	PŘÍLOHY VI – XVI (PŘEDNÁŠKY A POSTERY UVEDENÉ VE SBORNÍCÍCH)	117
6.	SHRNUTÍ	129
7.	ZÁVĚR	131
8.	SUMMARY	133
9.	SEZNAM LITERATURY	135

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Schéma plynulé disperze vzorku [2].....	10
Obrázek 2 - Schéma jednoduchého FIA systému	11
Obrázek 3 - Schéma jednoduchého SIA systému	12
Obrázek 4 - Schéma oboustranného toku v SIA [2]	13
Obrázek 5 - Znázornění systému "Lab-On-Valve" připojeného na selekční ventil SIA analyzátoru z chemicky inertního polymeru [2].....	15
Obrázek 6 – Schéma SI-LOV mikrosystému s víceúčelovou průtokovou celou pro měření absorbance v reálném čase [11].	15
Obrázek 7 – Znázornění SI-BI-LOV systému se dvěma pozicemi (C1 a C2) pro mikrokolony a vyobrazení samotné obnovitelné mikrokolony s mikrosférami sorbentu [16].....	16
Obrázek 8 – Schéma dvou možností použití BI mikrokolony. (a) eluce látek z mikrokolony do detektoru, (b) vymytí analytu i se sorbentem do detektoru (použitelné pokud sorbent při detekci neruší) [16].....	17
Obrázek 9 - Schéma extrakce na pevnou fázi, zadržení sledované látky, vymytí nečistot a následně eluce analytů [20].	24
Obrázek 10 - Schéma extrakce na pevnou fázi - přímá eluce analytu a retence interferujících látek na extrakční kolonce [20].....	25
Obrázek 11 - Znázornění charakteristik chromatografického píku [24].....	26
Obrázek 12 - Určení faktoru symetrie píku [24].	32
Obrázek 13 - Určení poměru signálu k šumu [24].	33
Obrázek 14 - Vysoce porézní monolitická tyčinka silikagelu [31]	41
Obrázek 15 - Makropóry \varnothing 2 μ m [31].	42
Obrázek 16 – Mezopóry \varnothing 13 nm [31].	43
Obrázek 17 - Monolitické kolony Merck® Chromolith™ [31].....	44
Obrázek 18 - Držák pro zapojení CIM disků firmy BIA Separations [66].....	45
Obrázek 19 - Schéma SIC systému.....	46
Obrázek 20 - SICrom™ analyzátor [89]	49

1. ÚVOD

Metody průtokové analýzy patří k nejrychleji se rozvíjejícím metodám, a tak se objevují další nové a moderní modifikace, jejichž uvedení do praxe závisí především na možnostech a perspektivách aplikací dané metody.

Na rozdíl od vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a plynové chromatografie (GC), které jsou dnes rutinně využívány v celé řadě analytických laboratoří, nejsou metody průtokové a sekvenční injekční analýzy (FIA a SIA) prozatím legislativně uznávané metody, s výjimkou několika aplikací v analýze životního prostředí.

Průtokové metody však splňují požadavky na automatizaci stanovení a on-line úpravu vzorků ze složitých matic vedoucí k eliminaci rizika vnesené chyby, snížení finanční náročnosti analytického procesu a v neposlední řadě k omezení manipulace personálu laboratoří s potenciálně nebezpečnými vzorky.

Techniky FIA a SIA umožňují svým principem, svojí jednoduchostí a robustností přístrojového uspořádání racionalizovat a automatizovat selektivní derivatizační reakce nebo úpravu vzorků a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení.

Vytvoření nové metody sekvenční injekční chromatografie (SIC) on-line zapojením krátké komerčně vyráběné monolitické chromatografické kolony do SIA systému se významně rozšiřuje možnost použití průtokových metod pro analýzu směsí.

2. CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo navázat na předchozí výzkum v oblasti průtokových metod na katedře analytické chemie, který započal v 80. letech konstrukcí jednoduchých průtokových FIA systémů. S narůstající náročností prováděných analýz byla metoda postupně modifikována např. zapojením dvojitých selekčních ventilů, reakčních cívek, oxidačně-redukčních reaktorů, kolonek se sorbentem pro extrakci na tuhou fázi, apod. Nedlouho po vzniku druhé generace FIA - metody „Sekvenční injekční analýzy“ (SIA) na University of Washington, USA byla tato metoda zavedena i na pracoviště Katedry analytické chemie FaF UK v HK. Byl sestaven originální SIA analyzátor s vlastním řídicím programem a výzkum se soustředil především na využití SIA techniky pro automatizované stanovení jednotlivých farmaceuticky významných látek v léčivých přípravcích, případně disolučních médiích a srovnání získaných výsledků s výsledky lékopisných metod.

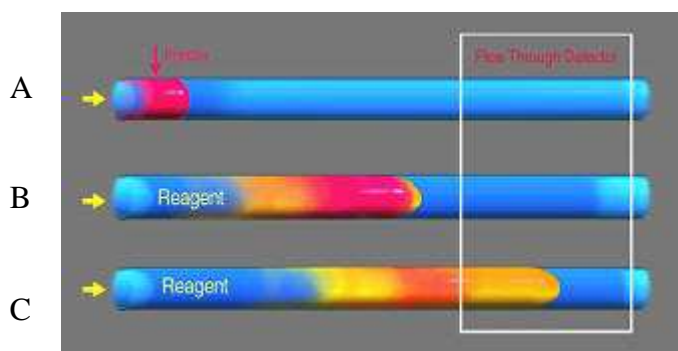
Předmětem mé práce bylo rozšířit poznatky o SIA, zejména poprvé vyzkoušet její propojení s monolitickou kolonou. Tato metoda byla originálně nazvána Sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography - SIC) a cílem bylo ověřit možnosti této metody pro analýzu vícesložkových směsných vzorků (aplikovat tuto novou metodu v oblasti farmaceutické analýzy se zaměřením na vícesložkové léčivé přípravky). Snahou bylo vytvořit metodu pro rychlé a na přístrojové vybavení nenáročné stanovení jednoduchých směsí. Při vývoji SIC byly také studovány a kriticky zhodnoceny její výhody a nevýhody v porovnání s klasickou HPLC.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. PRŮTOKOVÉ NESEPARAČNÍ ANALYTICKÉ METODY

3.1.1. Průtoková injekční analýza (FIA)

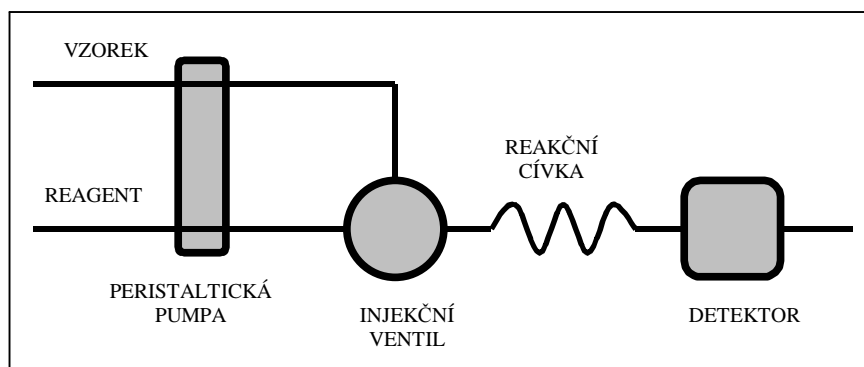
První generace průtokových metod - průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis – FIA) je založena na dávkování kapalného vzorku do mobilního, nesegmentovaného kontinuálního nosného proudu kapaliny vhodného složení, nejčastěji reakčního činidla. Při pohybu nadávkované zóny vzorku v nosném proudu dochází k disperzi analyzovaného roztoku do činidla s následnou chemickou reakcí za vzniku detekovatelného produktu, který je transportován do detektoru zaznamenávajícího požadovaný fyzikální parametr. Odezva detektoru se pak plynule mění v důsledku koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu analyzovaného vzorku průtokovou celou. Tvar získaného signálu ve formě píku je založen na koncentračním gradientu, který se vytváří na základě disperze vzorku a nosného proudu [1, 2]. Chemická reakce však probíhá pouze do určité míry, a proto jsou jednotlivé kroky analýzy Obrázek 1 (A – nadávkování vzorku do nosného proudu s činidlem, B – smísení vzorku s činidlem v nosném proudu, C – průchod reakčního produktu detektorem) časově přesně definovány, což je nezbytné pro maximální možnou reprodukovatelnost měření [3, 4, 5, 6].



Obrázek 1 - Schéma plynulé disperze vzorku [2]

Obecné schéma klasického FIA systému je znázorněno na Obrázek 2. Jednotkou generující konstantní tok nosného proudu je většinou vícekanálová peristaltická pumpa využívající obvykle pouze jednosměrný tok. Pomocí dávkovací jednotky, kterou

představuje dávkovací ventil (jednoduchý nebo dvojitý) ovládaný manuálně nebo programově počítačem, je do systému dávkována zóna vzorku. Množství dávkovaného vzorku je dáno délkou dávkovací smyčky připojené k ventilu, a proto je změna dávkovacího objemu nezbytně spojená buď s fyzickou výměnou této smyčky, nebo dobou dávkování, kdy můžeme využít pouze parciálního vymytí smyčky (nutná velmi dobrá časová synchronizace, nejlépe pomocí počítačem řízeného systému). Objem dávkovaného vzorku ve FIA technice není omezen jako například v separačních technikách kapacitou kolony, ale limitujícím faktorem je důkladné promísení zóny vzorku s reakčním činidlem, tak aby nedocházelo k rozdělení píků vlivem nedostatečné reakce uprostřed zóny vzorku. Při zajištění dostatečného promísení vzorku s reakčním činidlem pak může dávkovaný objem vzorku dosáhnout až 200 μl .



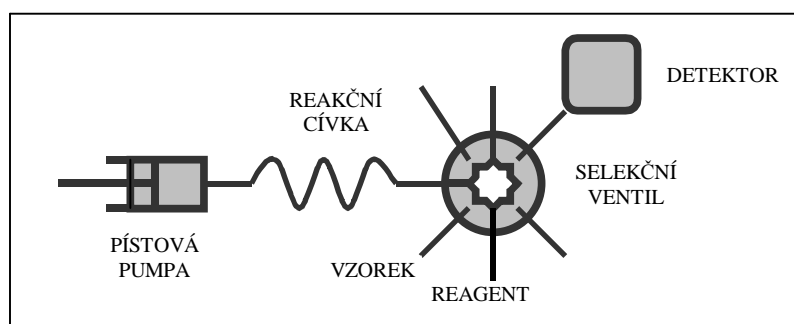
Obrázek 2 - Schéma jednoduchého FIA systému

Detekční jednotka FIA systému zajišťuje kontinuální monitorování roztoku procházejícího průtokovou detekční celou, jejíž objem bývá řádově v mikrolitrech, aby bylo možno odlišit ostrý pík vzorku od nosného proudu a zároveň nedocházelo k rozmývání vzorku v detekční cele. Způsoby detekce nejsou systémově omezeny a její volba je dána vlastnostmi analyzovaných látek (nejčastěji UV-VIS spektrofotometre, fluorimetrie, potenciometrie, konduktometrie, atd.). Prakticky každá detekční technika vyžaduje určitou geometrii průtokové cely, což je jediná odlišnost od konvenčně používaných detektorů.

3.1.2. Sekvenční injekční analýza (SIA)

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis – SIA), navržená v roce 1990 kolektivem pracovníků vedených profesorem Růžičkou a Marshalllem jako druhá generace průtokových metod, je modifikací průtokové injekční analýzy, z jejíž principů vychází a ke kterým připojila řadu dalších výhodných vlastností, které z ní učinily velmi praktickou, rychlou a téměř univerzální průtokovou analytickou techniku [7]. Ze základních vlastností průtokové injekční analýzy přebírá SIA nesegmentovaný tok nosného proudu a princip kontrolované parciální disperze zóny vzorku v nosném proudu.

Typická základní konfigurace konvenčního SIA systému je schematicky znázorněna na Obrázek 3.

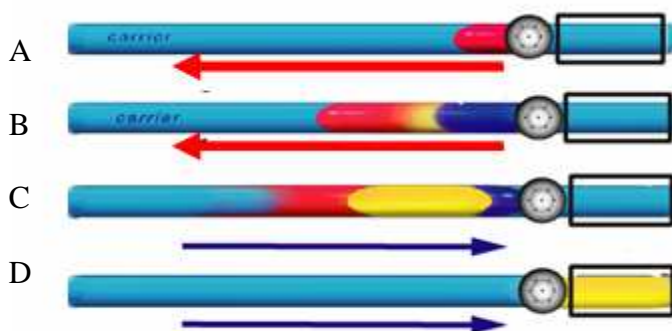


Obrázek 3 - Schéma jednoduchého SIA systému

SIA systém je tvořen jednonálovou nízkotlakou obousměrnou pístovou pumpou, je poháněna vysoce přesným krokovým motorem a je spojena s dvoucestným solenoidním ventilem. Ten je přes mísící cívku, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do pumpy spojen s vícecestným selekčním ventilem a vhodným detektorem. Mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou celou detektoru může být umístěna další mísící cívka, reakční kolonka, případně i monolitická chromatografická kolona. Cívky a spojovací materiál je obvykle tvořen PTFE hadičkami s vnitřním průměrem 0,5 – 0,8 mm. SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu pumpy, synchronizovaných s nastavením pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků jsou nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím

i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Nezbytnou součástí tohoto systému je počítač s příslušným programovým vybavením, který řídí jednotlivé kroky měřicího cyklu a současně sbírá, vyhodnocuje a uchovává výstupní data.

Nosný proud generovaný pístovou pumpou se v SIA pohybuje oběma směry a lze ho s výhodou zastavit v jakémkoliv místě průtokového systému. Do tohoto nosného proudu, kterým je většinou destilovaná voda, jsou aspirovány malé objemy vzorku a činidel přeměňujících analyt na stanovitelný produkt [8]. Aspirace probíhá přes selekční ventil o určitém počtu portů (6 – 12) využívaných podle požadované aplikace. Jednotlivé kroky jsou znázorněny na Obrázek 4.



Obrázek 4 - Schéma oboustranného toku v SIA [2]

Obecný postup SIA experimentu je následující: zóny vzorku a činidel jsou postupně aspirovány při plněním pohybu pístové pumpy do mísící cívky, která slouží pro smíšení uvedených zón. (A, B). Po obrácení směru toku nosného proudu jsou vzorek s činidly a produktem vznikajícím v místě jejich překryvu transportovány do detektoru (C, D) [7, 8]. Pro dosažení důkladnějšího promíchání bývá velmi často a efektivně využíváno několikanásobné změny směru toku. V některých případech pak probíhá další zpracování analytu v různých mísících cívkách připojených přes selekční ventil do SIA systému [9].

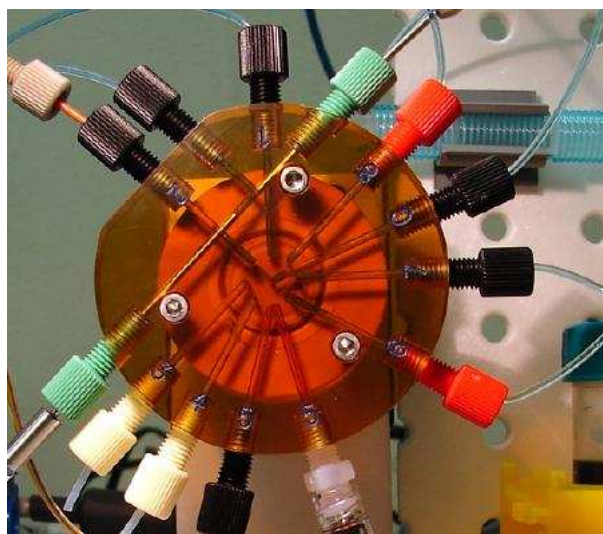
Geometrie takto aspirovaných zón je odlišná od FIA, kde se pohybují pouze jedním směrem a stejnou rychlostí celým průtokovým systémem. V SIA metodě jsou jednotlivé zóny po aspiraci naskládány vedle sebe v mísící cívce a při obrácení toku nosného proudu je umožněno jejich lepší překrytí a pronikání jedné zóny do druhé [8]. Tímto sice dochází k promíchání vzorku a činidla, ale vlastní disperze je daleko nižší

než u FIA kde je vzorek rozmýván nosným proudem. Dávkování přes selekční ventil probíhá jeho přetočením do zvolené polohy a nasátím příslušného objemu pomocí pístové pumpy, z čehož vyplývá, že je objem aspirované zóny velmi snadno definován v řídicím programu a lze jej jednoduše a rychle měnit. Také průtoková rychlost je variabilní a spolu s možností zastavení toku (stop-flow) představuje důležitý prvek, který po optimalizaci systému vede k rychlé analýze. Stop-flow metoda je využívána zejména pro chemické reakce s pomalou kinetikou, kdy po zastavení na určitou dobu získáme daleko větší podíl produktu reakce a odpovídající vyšší signál detektoru [10]. Výhodou SIA je mnohem menší spotřeba vzorku a činidel a tím pádem i menší produkce odpadu (asi desetinová), což je vhodné při práci s drahými, vzácnými nebo nebezpečnými látkami.

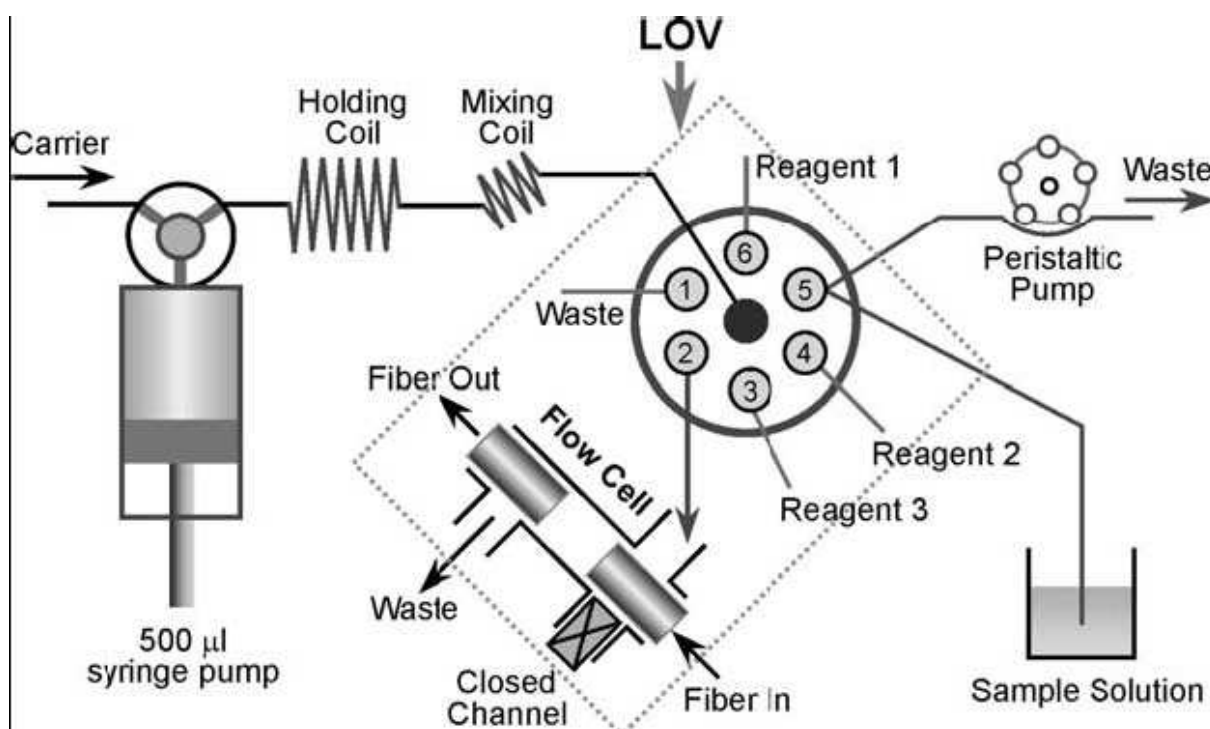
3.1.3. Lab-On-Valve (LOV)

Třetí generací průtokových metod je Lab-On-Valve (LOV, laboratoř ve ventilu) vytvořená v roce 2000. Podstatou je víceúčelový plexisklový (později i chemicky inertní) nástavec připojený přímo na šesticečný selekční ventil SIA přístroje Obrázek 5.

V nástavci je vytvořena detekční cela, což umožňuje miniaturizovat operace s kapalinami – dávkování, provedení reakce a následnou detekci [11]. Do detekční cely jsou vyvedeny optická vlákna optického detektoru, ale lze po úpravě použít i jiné detekční techniky (potenciometrie, konduktometrie, atd.). Schéma zapojení SI-LOV je na Obrázek 6.



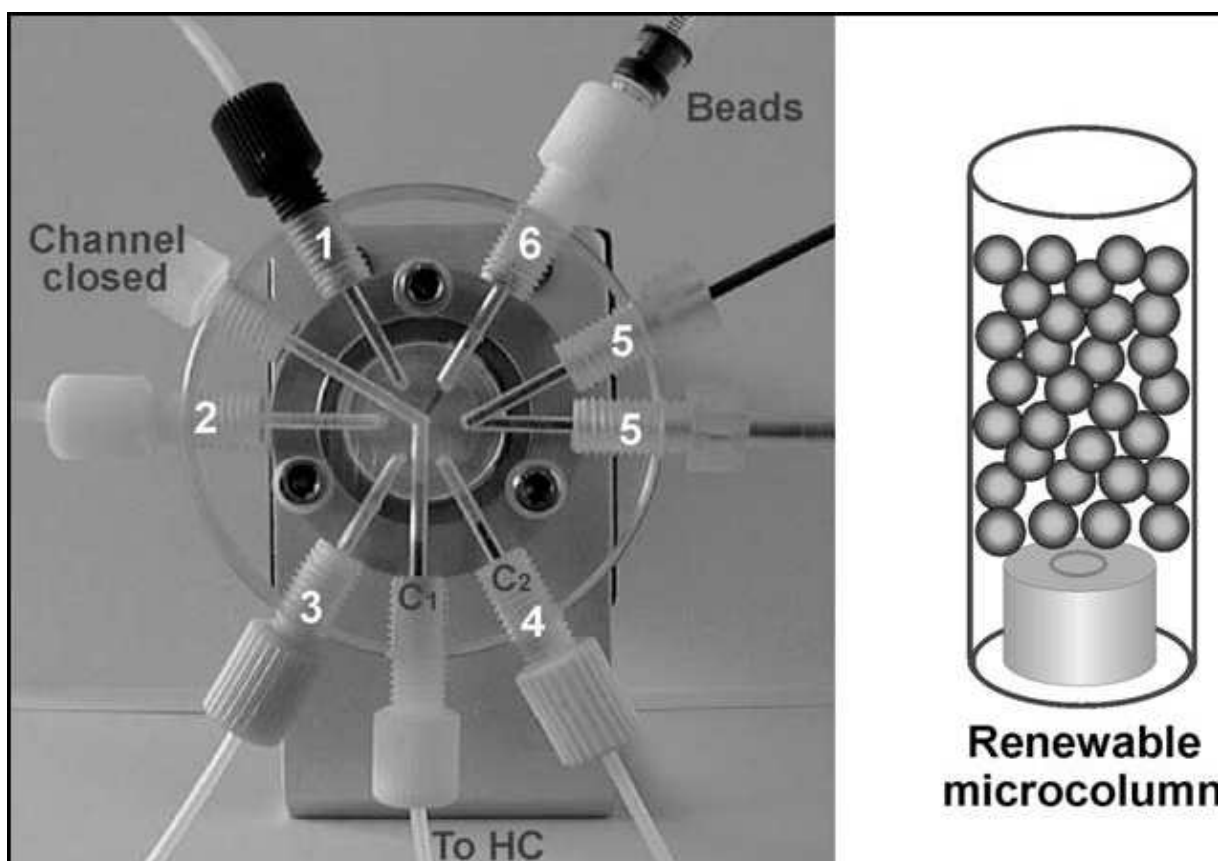
Obrázek 5 - Znárodnění systému "Lab-On-Valve" připojeného na selekční ventil SIA analyzátoru z chemicky inertního polymeru [2]



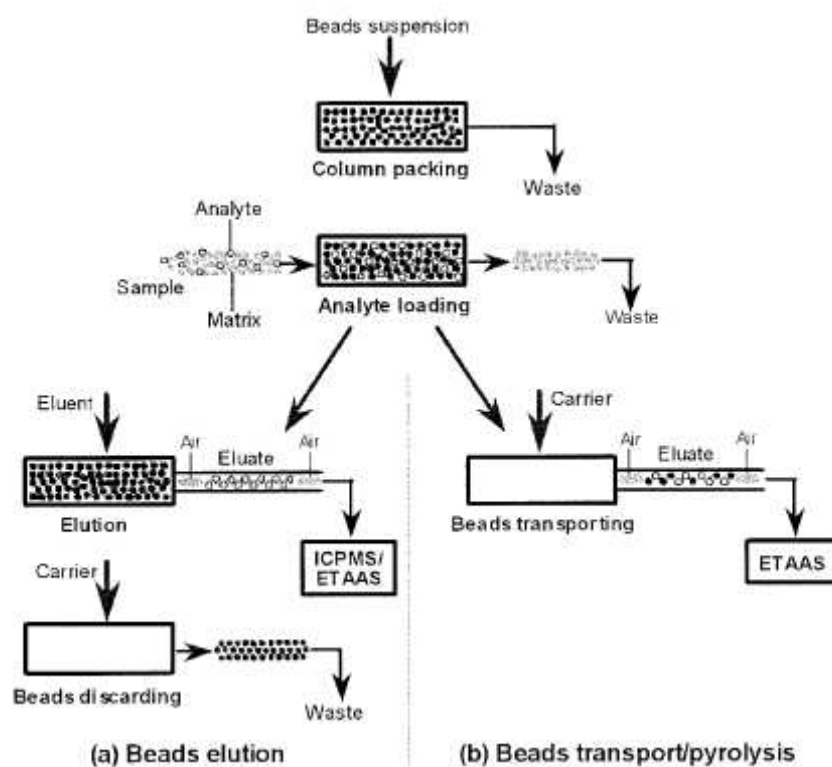
Obrázek 6 – Schéma SI-LOV mikrosystému s víceúčelovou průtokovou celou pro měření absorbance v reálném čase [11].

3.1.4. Bead injection (BI)

SIA technika umožňuje použití pevných částic v takzvané konfiguraci „jet-ring“ cely [12], jejímž principem je aspirace pevných částic (tzv. „bead injection“) [13] s imobilizovaným činidlem nebo enzymy do portu speciálně upraveného ventilu. Mikrosféry sorbentu jsou v suspenzi ve vodě nebo vhodném pufru většinou v poměru 1:10 - 1:20 (m/v). Po průchodu zóny vzorku přes naplněnou jet-ring celu dochází k reakci, v dalším kroku následuje vymytí částic pomocí obrácení směru toku nosného proudu. Při každém měření tak vzniká nová extrakční kolona přímo v systému nadávkováním suspenze obsahující částice sorbentu. Odpadají tak nutnost eluce a riziko zkřížené kontaminace vzorků. Nejčastěji se tento typ reaktoru používá pro extrakce na principu imunochemických reakcí [14, 15]. Nejprogresivnější se tato technika jeví v kombinaci s provedením „Lab-On-Valve“ - SI-BI-LOV na Obrázek 7 a Obrázek 8 [16].



Obrázek 7 – Znárodnění SI-BI-LOV systému se dvěma pozicemi (C1 a C2) pro mikrokolony a vyobrazení samotné obnovitelné mikrokolony s mikrosférami sorbentu [16].



Obrázek 8 – Schéma dvou možností použití BI mikrokolonky. (a) eluce látek z mikrokolonky do detektoru, (b) vymytí analytu i se sorbentem do detektoru (použitelné pokud sorbent při detekci neruší) [16].

3.1.5. Porovnání systémů FIA / SIA

Obě popsané průtokové techniky, FIA a SIA, mají stejný základní princip, ale liší se řadou vlastností, které je předurčují pro různé aplikace. Základní odlišnosti jsou přehledně uvedeny v Tabulka 1[6].

Tabulka 1 Porovnání FIA a SIA metody

Parametr	FIA	SIA
Nosný proud	kontinuální jednosměrný	diskontinuální obousměrný
Typ čerpadla	peristaltická pumpa	pístová pumpa
Typ dávkovacího ventilu	dvoupolohový injekční	selekční
Počet kanálů v systému	jeden a více	jeden
Objem vzorku	desítky – stovky μl	desítky μl
Průtoková rychlost	do 2 ml min^{-1}	až 10 ml min^{-1}
Objem odpadu	stovky ml	desítky ml
Frekvence analýz	až 300 vzorků/hod	do 120 vzorků/hod
Řízení systému	manuální nebo automat.	automatizované

Hlavním rozdílem FIA a SIA metody je geometrie nosného proudu, který se ve FIA pohybuje pomocí peristaltické pumpy pouze jedním směrem a je čerpán neustále i mezi jednotlivými kroky [4, 7, 8]. Naproti tomu technika SIA využívá změny směru toku nosného proudu aplikací pístové pumpy, kdy k pohybu dochází pouze při aspiraci vzorku a činidel nebo při transportu vzorku do detektoru. Možnost změny směru toku nosného proudu v SIA poskytuje tedy lepší promísení zóny vzorku a činidel v kratší vzdálenosti, než by bylo třeba použít ve FIA systému pro dosažení stejného stupně promísení. Další nespornou výhodou SIA systému je výrazně nižší objem spotřebovaných činidel i nosného proudu, protože na rozdíl od FIA není nosný proud přiváděn do systému kontinuálně. Rozdílné je tedy dávkování vzorku do systému, které u FIA probíhá propláchnutím určitého objemu dávkovací smyčky injekčního ventilu nosným proudem. Tento objem lze však měnit pouze fyzickou výměnou dávkovací smyčky, nebo dobou určenou k promytí při parciálním promytí smyčky. V SIA jsou

vzorek i činidla aspirovány pomocí selekčního ventilu a jejich objemy je proto možné jednoduše měnit pomocí řídicího programu [8]. Pokyny pro aspiraci, míchání a eluci do detektoru jsou tedy zadávány do programu přes počítač a nevyžadují fyzický zásah do systému. Stejně tak je pro složitější analýzy nutné rekonstruovat FIA systém a aplikovat další kanály, které pak často vytváří velmi komplikované soustavy s mnoha mísícími body negativně ovlivňující disperzi vzorku. SIA naproti tomu obsahuje pouze jeden hlavní kanál vedoucí od pístové pumpy přes selekční ventil k detektoru. Další „kanály“ jsou připojeny přes selekční ventil a lze je kdykoliv využít k různým účelům bez nutnosti rekonstrukce pro každou konkrétní aplikaci [4, 7, 8, 17].

Průtokové rychlosti se u těchto metod výrazně neliší. V SIA metodě se objevují vyšší hodnoty, které jsou dány možnostmi a především přesností pístové pumpy, zatímco peristaltická pumpa používaná ve FIA systému je omezena mechanickou odolností pryžových hadiček. Frekvence dávkování vzorků je ve FIA systémech o něco větší, protože se vzorky pohybují jedním směrem a analýza proto není zpomalena ani změnou směru toku ani plněním pracovního objemu pístové pumpy, což je v SIA nezbytné. Detekční techniky se neodlišují, nejsou systémově omezeny a vyžadují pouze zařazení průtokové detekční cely, jejíž parametry jsou dány metodou detekce a nemění se s typem použitého průtokového systému. V SIA se však objevují detekční cely, které vyžadují pro svou funkci obousměrný tok, a proto je ve FIA nelze aplikovat. Je to např. výše zmíněná jet-ring cela, která je plněna jedním směrem pevnými částicemi, které jsou po ukončení jednoho měření odstraněny opačným směrem toku.

SIA je závislá na řízení celého systému počítačem, což ve FIA metodě není nutným předpokladem [6], ale v dnešní době už manuální ovládání bývá spíše výjimkou.

Po zavedení SIA metody se při porovnání obou typů průtokové analýzy uváděly jako hlavní nevýhody SIA snížená frekvence dávkování vzorků a nutnost používat počítačovou techniku [7]. Dnes se s výhodou zapojují do měření jinak nevyužité porty selekčního ventilu pro zpracování několika vzorků najednou, čímž lze frekvenci dávkování upravit. Obě průtokové techniky jsou díky počítačovému ovládání snadno automatizovatelné, a tím je umožněno jejich vzrůstající praktické využití v analytických laboratořích různého zaměření.

3.1.6. Detektory v SIA

Způsoby detekce nejsou systémově omezeny a jejich volba je dána pouze vlastnostmi analyzované látky. Využívají se zejména spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory s příslušnými průtokovými celami. Dále budou podrobněji popsány pouze spektrofotometrické detektory, jediné které byly při práci použity.

- **UV-VIS spektrofotometrické detektory**

UV-VIS spektrometrický detektor patří mezi nejčastěji používaný detektor v SIA. Lze jej použít pro detekci mnoha látek, které absorbují v oblasti od 190 – 400 nm (UV) a 400 – 800 nm (VIS).

UV-VIS detektor může být použit v široké škále podmínek, používaná rozpouštědla však nesmí absorbovat v UV-VIS oblasti. Citlivost UV-VIS detektoru je velmi dobrá a vykazuje širokou oblast linearitu odezvy. Bez problémů lze provádět změnu složení nosného proudu (gradientovou eluci) [18].

Dříve byly často využívány jednoduché jednopaprskové UV-VIS detektory měřící jednu předem nastavenou vlnovou délku, zatímco dnes jsou populárnější detektory s diodovým polem (DAD) umožňující snímat absorbní spektrum v závislosti na čase. Výsledkem měření detektoru je trojrozměrný záznam, ze kterého se chromatogram při příslušné vlnové délce extrahuje. Tato možnost je důležitá pro získání kvalitativní informace o měřené látce, čímž je zvýšena spolehlivost analýzy. Citlivost je asi o 1 řád nižší než u jednopaprskových UV/VIS detektorů

U spektrofotometrických detektorů se v SIA nejčastěji používá teflonová Z-cela s optickou délkou 10 mm a vnitřním průměrem 1,5 mm. Malý objem cely je požadován pro dostatečné odlišení malého objemu analytu v zóně vzorku od základní linie poskytované nosným proudem, ale zároveň dostatečná optická délka pro citlivou detekci. Do této cely pak bývají zavedena optická vlákna, která přenáší světelný signál do detektoru. Problémy doprovázející optickou detekci představuje přítomnost bublin z rozpuštěného vzduchu nebo vznikající jako vedlejší reakční produkt [19]. Další problém mohou způsobovat rozdíly mezi indexem lomu zóny vzorku a nosného proudu, které se projevují rušivými píky – tzv. Schlieren efekt [19]. U nízkých signálů tak může být ovlivněna správnost a přesnost analýzy. Tento problém lze odstranit přidáním stejného rozpouštědla ke vzorku i nosnému proudem.

3.2. Úprava vzorků ve farmaceutické analýze

Farmaceutické léčivé přípravky většinou nemohou být přímo analyzovány bez předchozí úpravy vzorku. Proces úpravy vzorku může být obecně rozdělen na dvě části – vzorkování a vlastní úpravu vzorku tak, aby byla získána reprezentativní část analyzovaného vzorku [18].

3.2.1. Příímý nástřik

Tato metoda je používána jen pro tekuté lékové formy, které se dávkují přímo na analytickou kolonu. V případě vysoké koncentrace stanovovaných látek se vzorek ředí buď čistým rozpouštědlem nebo mobilní fází.

3.2.2. Extrakce z pevné lékové formy do kapaliny

Velmi často je třeba izolovat účinnou látku z pevných lékových forem. Izolace je provedena postupem zahrnujícím výběr rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel, která poskytuje ideální rozpustnost pro stanovovaný analyt a minimální rozpustnost pro interferující látky.

Tablety

Prvním krokem je rozmělnění nebo rozemletí pevné matrice na jemný prášek, poté následuje extrakce kapalným rozpouštědlem a filtrace nebo centrifugace pro odstranění eventuálně přítomných pevných částic.

Problémem takového postupu však může být fyzikální oddělování testovaného analytu v matrici, což lze eliminovat buď přímým rozpuštěním celé tablety přímo ve vhodném rozpouštědle (je-li tableta dokonale rozpustná) nebo prosíváním rozmělněného prášku přes síto.

Topické lékové formy

Před chromatografickou analýzou je třeba odstranit pevné částice menší než 2 μm , které by se jinak dostaly přes frity na chromatografickou kolonu, zachytily by se na sorbentu a snížili průchod kolonou což způsobuje nárůst zpětného tlaku v systému a pokles účinnosti chromatografické kolony.

Při použití metody, která používá filtraci vzorků, je třeba vzít v úvahu možnost adsorpce analytu na filtr. Tato adsorpce může být ovlivněna koncentrací analytu a také typem filtrační membrány.

3.2.3. Extrakce z kapaliny do kapaliny – LLE

Tento postup je užitečný zejména pokud je analyt rozpustný v jedné vrstvě rozpouštědla a interferující látky v druhé. Bohužel, takový případ nastává málokdy a proto se pro ovlivnění rozpustnosti využívá úpravy fyzikálních a chemických vlastností.

Výhodou této extrakční metody je její jednoduchost a nenáročnost na provedení a přístrojové vybavení. Lze ji využít jak pro extrakci většího množství látek, tak pro stopové koncentrace. Princip extrakce spočívá v rozdělení extrahované látky mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny dle rozdělovacího poměru (K) podle Nernstova zákona:

$$K = \frac{\text{koncentrace látky v organické fázi}}{\text{koncentrace látky ve vodné fázi}}$$

Slabé organické kyseliny a baze existují ve vodném roztoku v rovnovážných směsích neutrální a iontové formy v závislosti na jejich $\text{p}K_a$ a pH roztoku v němž se nachází. Pro účinnou extrakci do organického rozpouštědla je třeba, aby analyt byl alespoň 95% v extrahovatelné formě jako volná base nebo volná kyselina. Ve většině případů je třeba upravit pH vzorku na hodnotu o dvě jednotky nižší než je $\text{p}K_a$ kyselé látky nebo na hodnotu od dvě jednotky vyšší než je $\text{p}K_a$ bazické látky.

Vhodným poměrem objemů obou nemísitelných rozpouštědel je možné danou látku snadno zakoncertovat.

Překážkou extrakcí do kapalného rozpouštědla je někdy nedostatečná účinnost extrakce běžná zejména u iontových nebo amfoterních látek. Proto se pro zvýšení výtěžnosti a selektivity používá iont-párová extrakce založená na vzniku asociovaných

komplexů iontu vzorku a protiiontu opačného náboje. Iontové páry vytvořené mezi velkými organickými anionty a kationty jsou často rozpustné v málo polárních organických rozpouštědlech.

3.2.4. Extrakce na pevnou fázi - SPE

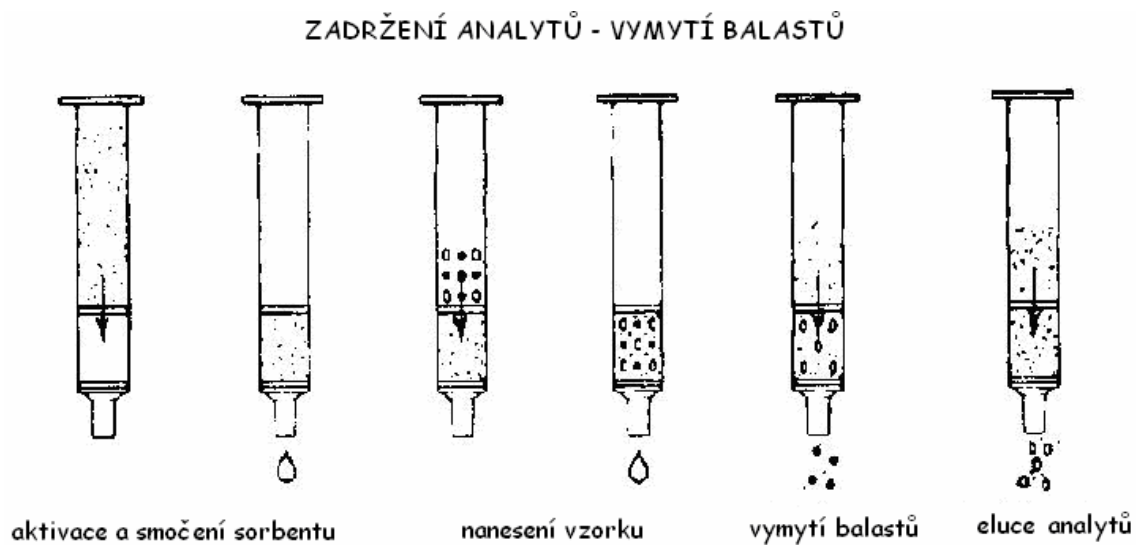
K extrakci látek před analýzou se často využívá extrakčních kolonek naplněných pevným sorbentem. Taková metoda se nazývá extrakce na pevnou fázi (liquid-solid extraction, solid phase extraction, SPE). Materiály používané k plnění SPE kolonek jsou obdobné materiálům používaným pro plnění HPLC kolon, ale velikost částic je v tomto případě větší (40 - 80 μm). Kolonky mívají průměr 10 mm a různé délky.

Mezi hlavní výhody SPE patří vysoká výtěžnost látek, jednoduché, šetrné a elegantní zakoncentrování analytů, čistota extraktu, časová nenáročnost, možnost automatizace a nízká spotřeba rozpouštědel a ekonomická náročnost.

Stejně jako u kapalinové chromatografie musí být postup extrakce na pevné fáze pečlivě optimalizován. Retence analytu závisí na koncentraci vzorku, povaze analytu, eluční síle rozpouštědla a charakteru sorbentu naplněného do extrakční kolonky.

Způsoby provedení extrakce na pevnou fázi:

Prvním způsobem je výběr rozpouštědla pro vzorek tak, aby sledované analyty zůstaly zadržené na sorbentu extrakční kolonky, zatímco látky, které by mohly interferovat jsou vymyty ven. Analyty jsou následně eluovány malým množstvím rozpouštědla z kolonky ven. Uvedený postup je velice užitečný zejména je-li analyt přítomen ve velmi nízké koncentraci, protože během extrakce na pevnou fázi dochází k jeho zakoncentrování Obrázek 9.

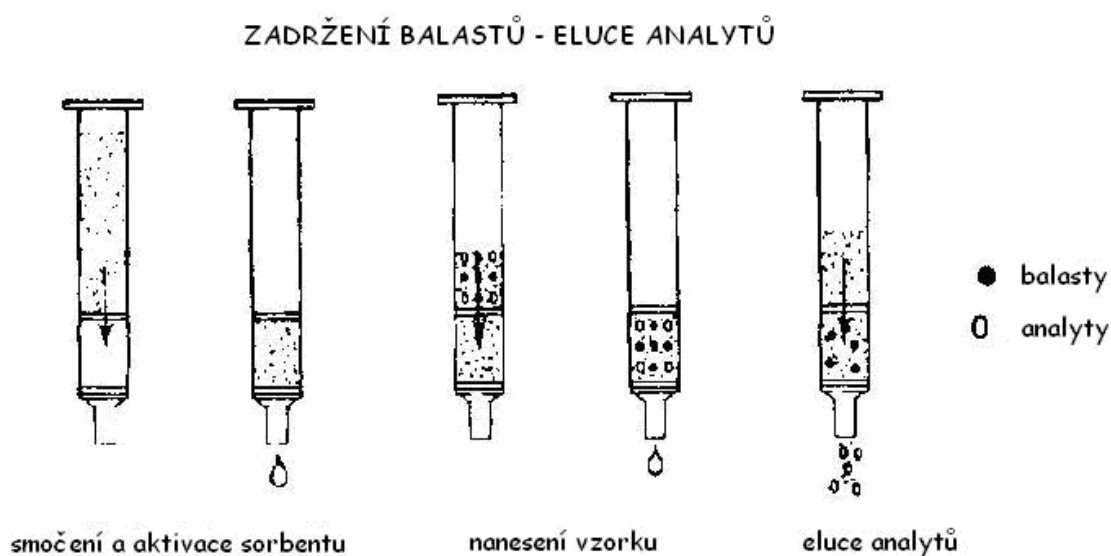


Obrázek 9 - Schéma extrakce na pevnou fázi, zadržení sledované látky, vymytí nečistot a následně eluce analytů [20].

Postup extrakce na pevných fázích (Obr.)

1. smočení sorbentu a aktivace sorbentu
2. aplikace vzorku na kolonku
3. vymytí balastů
4. eluce analytů (eventuelně odpaření vzorku do sucha a rekonstituce v minimálním množství vhodného rozpouštědla)

Alternativním postupem je zachycení interferujících látek na extrakční kolonce a eluce sledovaného analytu Obrázek 10.



Obrázek 10 - Schéma extrakce na pevnou fázi - přímá eluce analytu a retence interferujících látek na extrakční kolonce [20].

3.2.5. ÚPRAVA VZORKU V SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZE

V současnosti je patrná snaha o zavedení on – line úpravy vzorku v instrumentální analýze, což umožňuje analytické metody automatizovat a miniaturizovat a snižuje riziko vnesení chyby do celého procesu analýzy [21].

Sekvenční injekční technika ve spojení s jednotkami pro úpravu vzorku umožňuje racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení.

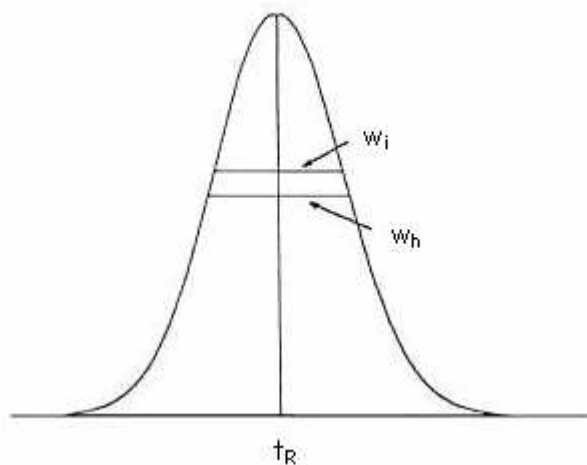
K nejčastějším technikám pro úpravu vzorku prováděným v SIA systému patří (kromě LOV a BI zmiňovaných v předchozích kapitolách) extrakce na pevnou fázi [22], dialýza a extrakce kapalina – kapalina [23].

3.3. Chromatografie

Chromatografický proces je ve své podstatě postupné, opakované, mnohonásobné ustalování rovnovážných stavů dělených látek mezi dvěma fázemi chromatografického systému. Nepohyblivá fáze systému se nazývá stacionární, pohyblivá složka je pak mobilní. K separaci látek dochází jejich interakcemi se stacionární a mobilní fází, zde záleží na fyzikálních a chemických vlastnostech jednotlivých látek které určují jejich afinitu k mobilní a stacionární fázi [18].

Idealizovaný chromatogram představuje řada gaussovských píků na základní linii. Jednotlivé chromatografické píky mohou být definovány retenčním časem (t_R) jako kvalitativním ukazatelem, plochou píku (A) nebo výškou píku (h) jako kvantitativními ukazateli a dále šířkou píku v poloviční výšce (w_h) a šířkou píku mezi body inflexe (w_i) [24]. .

Hlavními ukazateli kvality chromatografického systému jsou účinnost, selektivita a kapacita, podrobnosti budou uvedeny dále.



Obrázek 11 - Znázornění charakteristik chromatografického píku [24].

3.3.1. Retenční charakteristiky

- **Retenční čas a retenční objem**

Měření retence v eluční chromatografii je vyjádřeno retenčním časem (t_R) přímo definovaným jako vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné

z vrcholu píku odpovídajícího dané látce. Retenční čas je v kapalinové chromatografii důležitou kvalitativní charakteristikou látky a z něj může být odvozen retenční objem (V_R) podle vzorce:

$$V_R = t_R \cdot v$$

v němž značí:

- t_R – retenční čas
 v – průtoková rychlost mobilní fáze

- **Kapacitní faktor k' (Hmotnostní distribuční poměr nebo retenční faktor k')**

Kapacitní faktor popisuje retenci látky na analytické koloně. Vyjadřuje míru separace látky od mrtvého retenčního času. Čím vyšší je jeho hodnota, tím více je látka zadržována na koloně, eluuje později a tím lépe je tedy oddělena od mrtvého retenčního času.

$$k' = \frac{\text{množství látky rozpustné v SP}}{\text{množství látky rozpustné v MP}} = K_C \cdot \frac{V_S}{V_M}$$

v němž značí:

- SP – stacionární fáze
MP – mobilní fáze
 K_C – rovnovážný distribuční koeficient (známý jako distribuční konstanta)
 V_S – objem stacionární fáze
 V_M – objem mobilní fáze

Kapacitní faktor složky může být určen také z chromatogramu s použitím vzorce:

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem) nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

t_M – mrtvý čas (nebo objem) nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího nezadržované složce

- **Relativní retence**

Relativní retence (r) se vypočítá ze vzorce:

$$r = \frac{t_{R2} - t_M}{t_{R1} - t_M}$$

v němž značí:

t_{R2} – retenční čas sledovaného píku

t_{R1} – retenční čas referenčního píku

t_M – mrtvý retenční čas

3.3.2. Účinnost chromatografického systému

- **van Deemterova teorie pro účinnost chromatografického systému**

Dynamická van Deemterova teorie umožňuje popsat děje, které přispívají k rozmývání zón separovaných látek. V roce 1956 představil J. J. van Deemter rovnice popisující vztahy pro jednotlivé procesy ovlivňující rozšiřování chromatografických zón a vyjádřil také závislost účinnosti (HETP, H) na průtokové rychlosti.

Původně byly tyto zákonitosti popsány pouze pro plynovou chromatografii, ale uvedené fyzikální jevy jsou stejné i v kapalinové chromatografii. Rovnice odvozené pro

GC jsou tedy vhodné i pro aplikaci v kapalinové chromatografii. V původní interpretaci je rozšiřování chromatografické zóny dáno třemi nezávislými aditivními procesy^[18]:

- vířivou difúzí analytu v mobilní fázi při průchodu náplní kolony
- molekulární difúzí analytu v mobilní fázi
- odporem proti přenosu hmoty mezi mobilní a stacionární fází

Tato interpretace dobře vystihuje podmínky plynové a kapalinové chromatografie s použitím náplňových kolon. Výškový ekvivalent teoretického patra lze vyjádřit jako součet dílčích příspěvků:

$$H = H_p + H_d + H_M$$

- H - výškový ekvivalent teoretického patra
- H_p - příspěvek vířivé difúze k výškovému ekvivalentu teoretického patra
- H_d - příspěvek molekulární difúze analytu k výškovému ekvivalentu teoretického patra
- H_M - příspěvek odporu proti přenosu hmoty k výškovému ekvivalentu teoretického patra

- **Účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater**

Účinnost kolony (zdánlivá) je vypočítána jako zdánlivý počet teoretických pater (N) analytické kolony z dat získaných v závislosti na technice za podmínek izotermických, izokratických nebo izopyknických. Použije se následující vzorec, v němž hodnoty t_R a w_h musí být vyjádřeny ve stejných jednotkách (času, objemu nebo vzdálenosti):

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_h} \right)^2$$

v němž značí:

t_R – retenční čas (nebo objem), nebo-li vzdálenost podél základní linie od bodu nástřiku ke kolmici spuštěné z vrcholu píku odpovídajícího dané složce

w_h – šířka píku v polovině jeho výšky

Zdánlivý počet teoretických pater se mění se stanovovanou složkou, kolonou (vliv délky a průměru kolony i velikosti částic) a retenčním časem. Větší počet teoretických pater N znamená vyšší účinnost analytické kolony. Protože parametr N je silně ovlivněn délkou kolony, pro srovnání účinnosti analytických kolon je lepší používat parametr H (výškový ekvivalent teoretického patra).

- **Výškový ekvivalent teoretického patra**

Vedle počtu teoretických pater (N) se jako parametr vyjadřující účinnost kolony používá výškový ekvivalent teoretického patra H [μm], (někdy také HETP). Pro přesnější informaci je však do rovnice výpočtu zahrnuta i délka analytické kolony. Jelikož závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na počtu teoretických pater N je závislost nepřímo úměrná, menší hodnoty H značí vyšší účinnost analytické kolony. Při posuzování účinnosti chromatografického systému je tedy důležité uvědomit si, který z parametrů je právě použit pro porovnávání.

$$H = \frac{l}{N}$$

v němž značí:

N – počet teoretických pater

l – délka analytické kolony [μm]

3.3.3. Selektivita chromatografického systému

- **Rozlišení**

Rozlišení (R_s) je mírou separace mezi píky dvou složek, které mají podobnou výšku. Rozlišení větší než 1,5 odpovídá rozdělení píků na základní linii. Pro píky, které se vzájemně značně liší svými výškami, nemusí být tento uvedený vzorec vhodný pro výpočet:

$$R_s = \frac{1,18 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1} + w_{h2}}$$

kde $t_{R2} > t_{R1}$,

v němž značí:

t_{R1} a t_{R2} – retenční časy

w_{h1} a w_{h2} – šířky píků v poloviční výšce.

- **Selektivita**

Selektivita α se nejčastěji vyjadřuje jako poměr kapacitních faktorů píků sousedních látek v chromatogramu. Může být vyjádřena také jako poměr retenčních objemů sousedních látek v chromatogramu. Je žádoucí, aby hodnota parametru α byla vysoká. Selektivita chromatografického systému se vypočítá podle vztahu:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{V_{R2} - V_0}{V_{R1} - V_0}$$

v němž značí:

k_1, k_2 – kapacitní faktory dvou sousedních píků

V_0 – retenční objem v mrtvém retenčním čase, mrtvý retenční objem

V_{R1}, V_{R2} – retenční objemy sousedních látek v chromatogramu

3.3.4. Ostatní charakteristiky chromatografického procesu

- **Faktor symetrie**

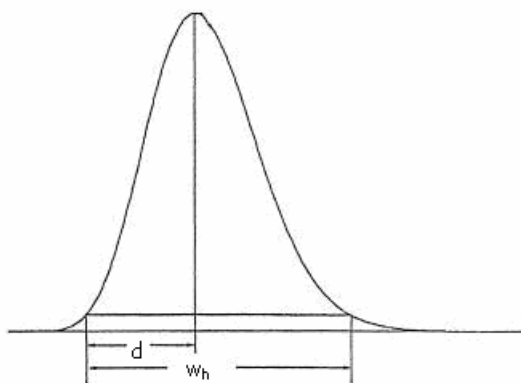
Faktor symetrie je parametr popisující symetričnost chromatografického píku. Jeho hodnota je důležitá z hlediska správné a reprodukovatelné integrace píku a v důsledku toho získání správných kvantitativních dat o analýze. Hodnota faktoru symetrie 1,0 značí úplnou (ideální) symetrii píku. Hodnoty faktoru symetrie píku vyšší než 1,0 značí tzv. „tailing“ nebo-li chvostování píku, naopak, hodnoty faktoru symetrie nižší než 1,0 značí tzv. „fronting“ nebo-li „frontování“. Faktor symetrie píku (A_s) (nebo-li faktor chvostování píku) se vypočítá ze vzorce:

$$A_s = \frac{w_{0,05}}{2d}$$

v němž značí:

$w_{0,05}$ – šířku píku v jedné dvacetině jeho výšky

d – vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v jedné dvacetině jeho výšky



Obrázek 12 - Určení faktoru symetrie píku [24].

- **Poměr signálu k šumu**

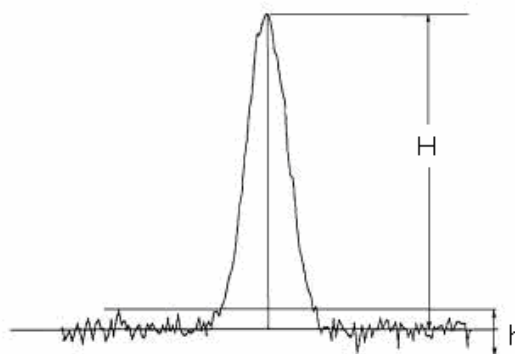
Poměr signálu k šumu (S/N), který ovlivňuje přesnost stanovení obsahu složek, se používá zejména k výpočtům parametrů citlivosti chromatografického systému a to limitu detekce a limitu kvantifikace. Vypočítá se ze vzorce:

$$S/N = \frac{2H}{h}$$

v němž značí:

H – výšku píku odpovídajícího dané látce na chromatogramu předepsaného roztoku měřenou od vrcholu píku k extrapolované základní linii signálu, který se sleduje ve vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky

h – rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce (upravený vzorek placebo farmaceutického přípravku) zaznamenávaného na vzdálenosti rovné dvacetinásobku šířky píku v polovině jeho výšky na chromatogramu předepsaného roztoku, a to pokud možno rovnoměrně na obě strany od místa, kde by se měl nacházet sledovaný pík



Obrázek 13 - Určení poměru signálu k šumu [24].

3.3.5. Mobilní fáze

Mobilní fáze je pohyblivou složkou chromatografického systému. Po nástřiku na chromatografickou kolonu unáší analyty a ty jsou podle své afinity buď zadržovány

stacionární fází nebo rychle eluovány z chromatografické kolony. V normálním modu kapalinové chromatografie se jako mobilní fáze používají nepolární organická rozpouštědla jako je chloroform, hexan nebo ether, zatím co v reverzním uspořádání kapalinové chromatografie bývají mobilní fáze polárního charakteru. Většinou je zastoupena organická složka (acetonitril, methanol, tetrahydrofuran) a vodná složka (voda, zředěné roztoky kyselin, pufrů, iontopárová činidla). Byla vytvořena tzv. eluotropická řada rozpouštědel, kde jsou jednotlivá rozpouštědla seřazena podle polarit [25].

Při optimalizaci chromatografických podmínek musí být zohledněny také vlastnosti rozpouštědel použitých pro přípravu mobilní fáze. Je-li při HPLC analýze použita detekce látek v UV oblasti, je nutné pečlivě vybírat vlnovou délku detekce v souladu s absorbcí sledovaných látek a také s absorbcí rozpouštědel a činidel použitých pro přípravu mobilní fáze.

Problémy, které vznikají v chromatografickém systému, jsou často způsobeny špatnou přípravou a použitím mobilní fáze. Může dojít k zavzdušnění systému, k zanesení in-line filtrů, frit nebo kapilár vlivem nečistot přítomných v mobilní fázi. Tyto komplikace se projeví zvýšeným zpětným tlakem na analytické koloně, zvýšeným šumem základní linie, kolísáním retenčních časů případně nevyhovujícím tvarem chromatografického píku.

Příprava mobilní fáze se řídí těmito doporučeními:

Pro přípravu mobilní fáze je nutné vždy používat rozpouštědla pokud možno co nejvyšší čistoty - HPLC grade. Toto platí i pro všechna aditiva (kyseliny, soli, baze) přidávaná do mobilní fáze.

Doporučuje se všechny připravené mobilní fáze filtrovat přes filtr 0,45 μm nebo menší. Je třeba se ujistit, zda použitý filtr je kompatibilní s danou mobilní fází. Voda používaná k přípravě mobilní fáze musí být čistoty ultračistá nebo HPLC grade (vodivost menší než 0,5 μS). Zcela nevhodné je použití pouze deionizované vody, protože obsahuje organické nečistoty, které mohou pozměnit účinnost kolony.

Pro přípravu a uchovávání mobilní fáze je vhodné používat stejné zásobní lahve, které je vždy třeba vypláchnout mobilní fází.

Zásobníky mobilní fáze mají být vždy umístěny výše než vstup do chromatografické pumpy.

- **Mobilní fáze obsahující pufr**

Při přípravě mobilní fáze jsou často používána aditiva, která slouží k úpravě pH nebo iontové síly mobilní fáze. Pro přípravu pufrovaných mobilních fází je třeba pracovat v oblasti pK daného pufru. Obvykle se pH vodné složky mobilní fáze upravuje na hodnotu o dvě jednotky nižší než je pK_a kyselého analytu, resp. o dvě jednotky vyšší než je pK_a bazického analytu. Je tak dosaženo nejvyšší pufrovací kapacity. Pufrovací kapacita kvantitativně vyjadřuje jak se změní pH pufru při přidavku malého množství kyseliny nebo baze.

pH mobilní fáze (respektive její vodné složky) se měří a upravuje ještě před přidavkem organického rozpouštědla, protože kyselost v organických rozpouštědlech se výrazně liší od pH vodných rozpouštědel nebo jejich směsí. Pro autoprotolytickou konstantu vody platí rovnice $K_{H_2O} = [H^+] \cdot [OH^-] = 10^{-14}$. Pro autoprotolytickou konstantu methanolu však platí $K_{MeOH} = [H^+] \cdot [CH_3O^-] = 10^{-16,6}$. To znamená, že v MeOH je prostředí neutrální pro koncentraci $[H^+] = [CH_3O^-] = 10^{-8,3}$ (nebo pH 8,3). Ve směsném rozpouštědle methanol – voda pak autoprotolytická konstanta leží mezi 10^{-14} až $10^{-16,6}$, protože vedle sebe vystupují anionty H^+ , CH_3O^- a OH^- . Methoxidový anion má vyšší nukleofilitu oproti OH^- a proto pufrы připravené v prostředí methanol – voda mají rozdílné vlastnosti proti čistě vodným pufrům.

Pro změnu pH pufrů v nevodných prostředích můžeme odvodit obecná pravidla. Pro slabé kyseliny (kyselina octová, $H_2PO_4^-$), pK_a stoupá, pro slabé zásady (NH_4^+) naopak pK_a klesá. Při přípravě pufrovaných mobilních fází se většinou upravuje pH mobilní fáze a to s přesností na 0,1 jednotky pH, protože i malá změna pH mobilní fáze může vést ke změně retence analytu.

Existuje několik způsobů přípravy pufrovaných mobilních fází

Prvním ze způsobů je dosažení vypočtené koncentrace a pH pufru pouhým smícháním požadovaného množství kyseliny a baze a doplněním vodou na definovaný objem (např. roztok hydroxidu sodného a kyseliny octové). Chyba pH takto

připraveného pufru se pohybuje kolem 0,1 jednotky pH, protože není počítáno s aktivitními koeficienty.

Druhým způsobem je připravení přesné koncentrace kyseliny (resp. baze) a přidání menšího množství baze (resp. kyseliny) než odpovídá požadovanému (vypočtenému) množství. pH takto připraveného pufru se pak upravuje pod pH metrem bazí (nebo kyselinou) na požadované pH pufru.

Třetí způsob přípravy pufrovaných mobilních fází se příliš obecně nedoporučuje a používá se pouze v případech, kdy velmi malá změna pH má vliv na retenci analytu. Tento způsob upřednostňuje úpravu pH mobilní fáze až po smísení s organickou složkou mobilní fáze.

Výhodou prvního způsobu je rychlá příprava mobilní fáze, druhý způsob je vhodný pro přípravu mobilních fází s přesně definovaným pH mobilní fáze.

• **Odplynění (degassing) mobilní fáze**

Odplynění mobilní fáze je velmi důležitý krok při její přípravě, protože může odstranit mnoho problémů vznikajících při chromatografické analýze. Odvzdušnění mobilní fáze přináší výhody v podobě reprodukovatelných retenčních časů, stabilního průtoku mobilní fáze, nízkého šumu základní linie.

K odplynění mobilní fáze se používají tyto metody, které se mohou vzájemně kombinovat:

- probublávání mobilní fáze heliem (sparging)
- ultrazvuková lázeň (sonikace)
- vakuová filtrace

Probublávání mobilní fáze heliem (sparging)

Při probublávání rozpouštědla heliem dochází k vytěsnění méně rozpustných plynů v mobilní fázi plynem rozpustnějším, které jej uchovává v ekvilibrovaném stavu. Použití této metody zpomaluje mikrobiální růst a oxidaci rozpouštědel, které přecházejí snadno na peroxidové formy (např. tetrahydrofuran).

Vakuová filtrace a sonikace

Vakuová filtrace snižuje tlak na povrchu solventu, bohužel samotné vakuum je příliš slabé a nedochází k dokonalému odplynění solventu. Může se kombinovat se sonikací za použití ultrazvukové lázně, kdy dochází k rozptýlení submikro-bublinek plynu, které se shlukují v rozpouštědle.

Hlavní výhodou vakuové filtrace při použití 0,45 μm filtru je i dokonalé zbavení mobilní fáze mechanických nečistot. Tento krok by neměl chybět při každé přípravě mobilní fáze.

3.3.6. Vlnová délka detekce

U většiny vzorků je vlnová délka detekce látek podstatná pro získání dobrých analytických výsledků. Výběr vlnové délky vychází ze znalosti UV spekter jednotlivých sledovaných komponent vzorku. Jsou-li dostupné standardy analytů, je vhodné změřit jejich UV spektra v příslušných rozpouštědlech před započítáním optimalizace HPLC podmínek. Alternativou může být změření UV spekter pomocí DAD detektoru během vývoje metody.

Vlnová délka vybraná pro detekci musí být kompromis různých absorbancí sledovaných analytů přítomných v různých koncentracích (např. je dobré zohlednit nízká množství nečistot vzhledem k vysokým množstvím účinných látek a posunout vlnovou délku detekce směrem k absorpčnímu maximu nečistot) a také akceptovatelné propustnosti mobilní fáze. V některých případech je nutné zvolit detekci tak, aby docházelo k co nejnižší absorpanci interferujících látek [26].

3.3.7. Objem nástřiku

Kapacita analytické kolony je vyjádřena jako maximální množství vzorku, které je daná kolona ještě schopna separovat, kdy tedy ještě nedojde k jejímu přetížení („overload“). Přetížení kolony je definováno jako množství vzorku nadávkované na kolonu, které způsobí pokles účinnosti na 90 % normální účinnosti (tedy o 10 %). Kapacita pro každý vzorek závisí na mnoha faktorech – typ analytické kolony, složení mobilní fáze, složení samotného vzorku, způsobu detekce atd.

Pro široké spektrum dávkovaných vzorků nemá množství vzorku vliv na retenci, separační účinnost a rozlišení jednotlivých píků. Náhodné či úmyslné dávkování vzorku mimo potřebné limity vede k nepředvídatelným změnám v separaci, které jsou popisovány jako přetížení analytické kolony – „overload“.

Existují dva způsoby přetížení kolony, tzv. „Volume overload“, tedy objemové přetížení, kdy je na kolonu dávkován větší objem, než je kolona schopna separovat a „Mass overload“, nebo-li přetížení hmotou, kdy je na kolonu dávkována větší koncentrace látky, než je kolona schopna účinně separovat.

Je-li dávkované množství vzorku neúměrně zvýšeno, dojde k rozšiřování chromatografické zóny, poklesu účinnosti separace, snížení retenčních časů a ke zhoršení rozlišení píků. Množství dávkovaného vzorku by mělo být zohledněno, aby se předešlo těmto nežádoucím změnám v separaci, aby se zvýšila citlivost detekce při použití co nejvyššího možného množství vzorku a aby byl maximalizován výtěžek v preparativní chromatografii.

Pro analytické separace je vhodné rozpouštění vzorku v mobilní fázi. Dojde tak k eliminaci rozdílu mezi rozpouštědlem pro vzorek a mobilní fází. Dávkovaný objem vzorku lineárně závisí na mrtvém objemu používané kolony, na účinnosti chromatografické kolony a na hodnotách k' jednotlivých látek. Výpočet optimálního objemu vzorku V_L (maximální možný objem vzorku) dávkovaného na analytickou kolonu se dá vypočítat podle vzorce:

$$V_L = V_0 * \left[(\alpha - 1) * k'_A - \frac{2}{\sqrt{N}} * (2 + k'_A + k'_B) \right], \text{ zjednodušeně: } V_L = V_0 * a/\sqrt{N}$$

v němž značí:

V_0 - mrtvý retenční objem

N - počet teoretických pater

α - relativní retence (k'_B / k'_A)

k'_A, k'_B - kapacitní faktory látek

a - konstanta

Přestože je na kolonu dávkováno malé množství vzorku, může dojít k přetížení hmotou. Důvodem je to, že kolona má limitovanou kapacitu pro zadržování vzorku – stacionární fáze může být satureována vzorkem. Optimální množství vzorku M (maximální možná hmota vzorku) dávkovaného na analytickou kolonu se dá vypočítat podle vzorce:

$$M = C_1 * \pi * r^2 * l * K_D * d * A_s * \sqrt{C_2 \frac{d_p^2}{l}}$$

v němž značí:

C_1, C_2 - konstanty

d - hustota náplně

r - průměr kolony

A_s - povrch sorbentu

l - délka kolony

d_p - průměr částice

K_D - rozdělovací koeficient

V praxi se však teoretické přístupy používají málo. Obvykle se experimentálně dávkuje zvyšující se množství vzorku, dokud nezačnou být pozorovány negativní změny.

3.3.8. Rozdělení chromatografických metod

Existuje mnoho způsobů rozdělení chromatografických metod [27, 28, 29]. Podrobněji bude rozebrána adsorpční chromatografie.

- **různá hlediska rozdělení chromatografických metod**

- 1) povaha mobilní fáze: plynová (GC), kapalinová (LC)
- 2) způsob provedení: kolonová (sloupcová), plošná (planární)
- 3) princip separace: adsorpční, rozdělovací, iontově výměnná, gelová, afinitní, chirální
- 4) pracovní způsob: eluční, frontální, vytěšňovací
- 5) účel: analytická, preparativní (preparační)

Adsorpční chromatografie

Adsorpční chromatografie využívá rozdílné adsorpce molekul analytů na povrch pevné stacionární fáze s aktivními centry. Separace analytů je založena na opakované adsorpci a desorpci. Mobilní fází je v kapalinové chromatografii kapalina (LSC, liquid-solid chromatography).

V adsorpční kapalinové chromatografii se dále používá rozdělení podle polaritý fází. Při chromatografii na normálních fázích je stacionární fáze silně polární (např. silikagel) a mobilní fáze je nepolární (hexan, chloroform). Polární látky jsou takto zadržovány na polárním povrchu stacionární fáze déle než látky nepolární. Chromatografie na normálních fázích využívá hlavně polárních interakcí dipól-dipól.

Naopak, chromatografie na reverzních fázích používá nepolární stacionární fázi (hydrofobní modifikace silikagelu jako je např. C18 nebo C8) a mobilní fází je polární kapalina (např. směsi vody, acetonitrilu nebo/a methanolu). V tomto uspořádání kapalinové chromatografie dochází k silné retenci nepolárních látek [30]. V chromatografii na reverzních fázích jsou hlavními interakcemi zejména hydrofobní interakce.

Existují však některé typy stacionárních fází, které lze použít v obou uspořádáních adsorpční kapalinové chromatografie, jako jsou třeba silikagelové fáze modifikované –CN nebo –NH₂ skupinou.

Výše zmíněné typy stacionárních fází pokrývají asi 90% všech chromatografických aplikací.

3.4. Monolitické chromatografické stacionární fáze

Monolitické chromatografické stacionární fáze se vyznačují naprosto odlišnou strukturou v porovnání s konvenčními stacionárními fázemi. Zatímco běžně používané kolony jsou plněny malými sférickými částicemi sorbentu, monolitické kolony obsahují sorbent, který není tvořen částicemi, nýbrž jedním kusem monolitního porézního materiálu [31, 32, 33, 34, 35, 36] Obrázek 14 [31].



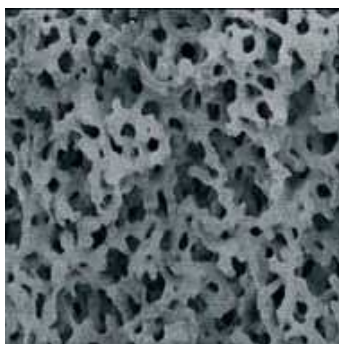
Obrázek 14 - Vysoce porézní monolitická tyčinka silikagelu [31]

Monolitické materiály byly vyvinuty především pro separaci vysokomolekulárních látek, přírodních či syntetických, při vyšších průtokových rychlostech. Hlavní uplatnění tak nacházejí v kapalinové chromatografii [37, 38, 39, 40] a v kapilární elektrochromatografii [41, 42, 43, 44], jejich potenciál využití je však široký a lze jej spatřovat např. v extrakci na pevnou fázi [45], katalýze [46], imobilizaci enzymů [46], případně reakcích na pevné fázi [47].

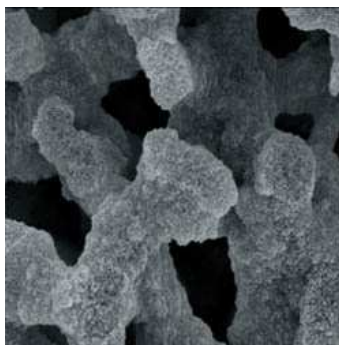
První práce zabývající se přípravou jednodlitých separačních materiálů se objevily na přelomu 60. a 70. let minulého století. Trvalo 20 let, než byly překonány praktické problémy, jako např. nízká permeabilita sorbentu nebo schopnost materiálu bobtnat a měknout v některých organických rozpouštědlech, a než se tyto materiály začaly úspěšně začleňovat do separačních technik [48]. První úspěšnou separaci provedli v roce 1989 Hjertén a kol. na „komprimovaných polyakrylamidových gelech“ [32]. Na počátku 90. let pak byly zavedeny monolity na bázi makroporézního organického polymeru [33] a v roce 1996 byla publikována příprava anorganických monolitů na bázi silikagelu [34, 35]. Dnes jsou monolitické materiály označovány za čtvrtou generaci chromatografických sorbentů [49].

Výroba monolitů je odlišná od klasické přípravy stacionární fáze. Vyrábí se speciální „sol-gel“ technologií, což je postup během kterého dochází k radikálové polymerizaci monomerů výchozího materiálu (polymerizace za zvýšené teploty nebo polymerizace iniciovaná UV zářením) nebo polykondenzací tetraalkylsiloxanů v případě silikagelu. Pomocí síťovadel a porogenních rozpouštědel dochází k formulaci vysoce porézního materiálu. To se provádí buď in situ přímo v trubici kolony či v kapiláře (polymerní monolity) a nebo se tyčinky vyrábí odděleně (monolity na bázi silikagelu). Případná modifikace C18 skupinou probíhá pak již s monolitem umístěným v koloně z tzv. smršťivého materiálu.

Takto vyrobený sorbent na bázi silikagelu obsahuje dva druhy pórů. Větší póry (průměr obvykle 2 μm) se nazývají makropóry Obrázek 15, díky nimž je odpor kolony velmi malý a umožňuje použití vyšších průtoků mobilních fází bez negativního zvýšení zpětného tlaku. Menší póry - mezopóry Obrázek 16 (průměr obvykle 13 nm) tvoří velký účinný povrch sorbetu s dostatečnou vazebnou kapacitou, a tím umožňují velmi dobrou separační účinnost takto naplněných analytických kolon [³¹].



Obrázek 15 - Makropóry \varnothing 2 μm [³¹].



Obrázek 16 – Mezopóry ϕ 13 nm [31].

Díky těmto vlastnostem mají monolity velice výhodný profil van Deemterovy křivky a mohou tak být používány vyšší průtokové rychlosti, při čemž rozlišení píků i separační účinnost systému zůstává zachována. Dochází k výraznému zkrácení času analýzy. Dalšími výhodami je možnost použití průtokového gradientu a velmi krátký čas potřebný ke zpětnému ustálení analytické kolony [31].

Pro výrobu monolitických kolon se často používá silikagel buď čistý v normálním uspořádání kapalinové chromatografie [50] a nebo modifikovaný ODS v reverzním uspořádání [51]. Dalšími modifikacemi jsou např. pentafluoro-fenyl-propyl-dimethyl skupina, pentafluorofenyl, 3,3,3-trifluoropropyl, n-oktamethyl, perfluorohexyl nebo aminopropyl opět v reverzním uspořádání fází [52].

Silikagel, jak bylo uvedeno, není jediným materiálem pro výrobu monolitů. Používají se také různé polymery jako polymethakryláty [53, 54], methakryloxypropyltrimethoxysilan [55], kationický stearyl-akrylát [56], akrylamidy [57], poly(styren-divinybenzen) [58], vinylpyridiny, vinylpyrrolidon, vinyl acetát [59] nebo urea-formaldehydová pryskyřice v afinitní chromatografii [60]. Pro účely chirálních separací se používá silikagel modifikovaný chirálními selektory jako jsou L-fenylalaninamid, L-alaninamid nebo L-prolinamid [61].

Všechny monolitické stacionární fáze mohou být rozděleny do tří kategorií: monolitické kolony – mohou být také endcapované (existují jako analytické kolony, kapilární kolony a mikročipy). Vyrábí se z rozličných materiálů od silikagelu přes různé typy polymerů. Druhou skupinou jsou monolitické disky (makropórní polymerní disky), které slouží zejména k účelům velmi rychlých a vysoce účinných separací bílkovin a nukleových kyselin. Třetím typem jsou monolitické trubky (nazývané též

tubulární kolony s radiálním tokem) sloužící např. pro iontovou výměnu v chromatografii nebo pro preparativní účely [33].

Většina monolitických kolon je připravována v laboratoři, kde se pak také testují a optimalizuje se způsob jejich přípravy. Z toho vyplývá, že výzkum monolitických kolon je spíše zaměřen na vývoj nových materiálů a nových postupů pro jejich přípravu [62, 63] než na jejich aplikační využití.

Aplikační využití monolitů je populární zejména v kapilární elektrochromatografii [64, 65]. Organické polymery se osvědčily hlavně při separacích velkých molekul, zatímco silikagelové monolity jsou vhodnější pro malé molekuly.

3.4.1. Komerčně dostupné monolitické kolony

Dnes jsou již některé monolity také komerčně dostupné např. Chromolith™ (silikagel s reverzní modifikovanou fází, firma Merck®, Darmstadt, Německo) Obrázek 17, Shift (iontovýměnná i reverzní fáze na bázi polymethakrylátových nebo polystyrénových kopolymerů, ISCO, Lincoln, USA) nebo Monoliths (reverzní polystyrénová fáze, LC Packings, Amsterdam, Holandsko) [33]. Nově dostupné monolitické kolony začala v poslední době vyrábět firma Phenomenex® (dodavatel Chromservis, Praha, Česká Republika) pod značkou Onyx™ (stacionární fáze je buď silikagel nebo silikagel modifikovaný C18 nebo C8 skupinou).



Obrázek 17 - Monolitické kolony Merck® Chromolith™ [31]

3.4.2. Komerčně dostupné monolitické disky

Monolity na bázi polymetakrylátu jsou komerčně dostupné u firmy BIA Separations (Lublaň, Slovinsko) ve formě CIM[®] (Convective Interaction Media) disků. Do speciálně vyvinutého držáku Obrázek 18 je možno umístit jeden až čtyři disky a měnit tak délku vzniklé kolony. Další výhodou tohoto přístupu je možnost kombinace různých typů sorbentů (kvartérní amin, diethylamin, C18, protein A a mnoho dalších) v rámci jedné separace a vytvořit tak vícedimenzionální separaci. Tyto disky jsou vhodné pro velmi rychlé analýzy zejména biologických vzorků [66].

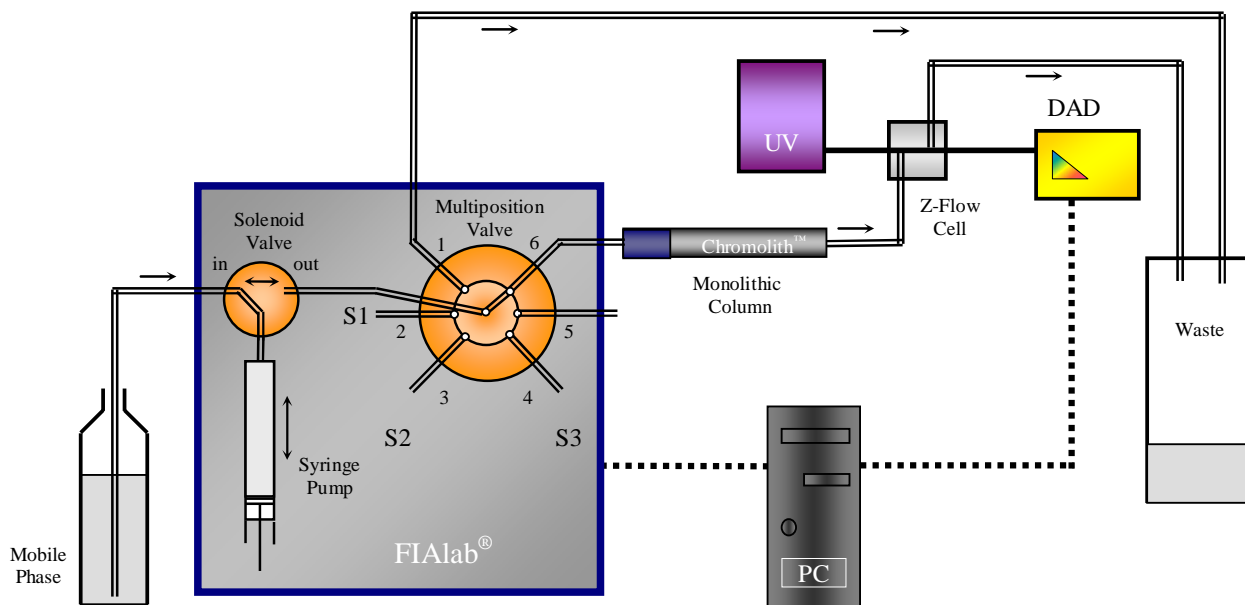


Obrázek 18 - Držák pro zapojení CIM disků firmy BIA Separations [66].

3.5. Sekvenční injekční chromatografie SIC

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) vznikla zařazením komerčně dostupné krátké monolitické kolony do systému SIA. SIC otvírá novou cestu v sekvenční injekční analýze – řeší problém simultánního stanovení látek ve vícesložkovém vzorku pomocí chromatografické separace a tím umožňuje současné stanovení několika látek ve směsi nebo v matici.

Výše zmíněné vlastnosti monolitických kolon umožňují jejich zapojení do SIA přístroje (nízkotlaké průtokové metody, kde maximální tlak který je schopna pístová pumpa v SIA je asi 2,5 MPa) a tím rozšíření možností této metody. Krátká komerčně dostupná monolitická kolona je zapojena mezi vícecestný selekční ventil a průtokovou celu detektoru Obrázek 19. Nově vyvinutá metoda zachovává výhody klasické SIA a přináší nové možnosti. Díky úspěšnému začlenění monolitických kolon do SIA systému [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73] se značně rozšířil potenciál metody a její význam v praxi. V porovnání s běžnými separačními technikami (HPLC, CE) pak separace v SIA umožňuje snížit náklady na analýzu (nekontinuální tok – úspora činidel a organického odpadu, a zejména nižší finanční náročnost na instrumentaci).



Obrázek 19 - Schéma SIC systému

V SIA byl až doposud řešen problém simultánního stanovení látek ve vícesložkovém vzorku a to v přítomnosti dalších složek nebo matrice použitím selektivních detektorů nebo různých analytických nástrojů a přístupů. Zde lze zmínit fluorescenci např. pro stanovení komplexu naproxenu s β -cyclodextrinem ze vzorku bez jeho předchozí úpravy extrakce nebo separace [74], chemiluminiscenci pro monitorování glukózy a penicilinu během kultivace s využitím specifických reakcí [75], selektivní senzory – iontově selektivní elektrody citlivé na G-penicilinová antibiotika pro analýzu farmaceutických produktů [76], selektivní extrakce – mikrokolona s iontově výměnnou pevnou fází pro simultánní stanovení 4-benzofenonu a fenylobenzimidazol sulfonové kyseliny ve sprejích na opalování [77], infračervenou spektroskopii s Furierovou transformací pro stanovení organických kyselin a cukrů v nápojích [78], použití C18 RAM pevných fází pro extrakci furosemidu při přímém stanovení v séru [79], liquid-liquid mikroextrakci pomocí Lab-On-Valve (LOV) a dělicí nádobku pro stanovení difenhydramin hydrochloridu v léčivých přípravcích [80], reakční kolony – redukční kadmiová kolona pro stanovení dusitanů a dusičnanů ve vodě [81, 82], jednotku pro difúzi plynů při stanovení amoniaku ve vzorcích polutantů [83], dialýzu pomocí celulósových membrány pro stanovení pH, chloridových a nikelnatých iontů v elektrolytických lázních [84], LOV pro spektrofotometrické stanovení mědi a železa v odpadních vodách [85], LOV s chelatačním činidlem zakotveným na mikrosférách sepharosy pro stanovení stopových množství kadmiových, olovnatých a nikelnatých iontů atomovou absorpční spektroskopií [86], selektivní reakce pro stanovení síry v pohonných hmotách [87], matematické modely – multivariační kalibrace pro stanovení analytů v přítomnosti matrice bez předchozí úpravy vzorku [88].

Prvním úkolem při tvoření metody bylo ověřit možnost zapojení kolony do systému, použití vhodných spojovacích hadiček a PEEK-ových šroubů a ověření funkčnosti celého systému vzhledem k zvýšení tlaku uvnitř systému. Dále také určení možností celého systému – velikost pístové pumpy (2,5; 5,0; 10,0 ml), její pracovní rychlosti, využití jednotlivých vstupů selektivního ventilu, optimalizace hadiček – délka a průměr, dále optimální průtokovou celou, možnosti mobilních fází – složení, omezené množství pro jednu analýzu, možnosti vzorků – předúprava, složení, velikost nástřiku pro jednu analýzu, použití detektoru – vlnové délky, sběr dat a v neposlední řadě

vyzkoušení kolon různých délek – 2,5 a 5,0 cm v kombinaci s předkolumnami o délkách 0,5 a 1,0 cm.

- **SICrom™ Accelerated Liquid Chromatography System**

SICrom™ je první komerčně dostupný LC analyzátor založený na SIA technice Obrázek 20. Je jednoduchý a dostatečně robustní přístroj skládající se z vylepšené pumpy, chemicky odolného LOV a monolitické kolony. Díky jednoduché a přehledné konstrukci je snadné naprogramovat celé měření a odstraňovat vzniklé problémy.

Výhody jsou zřejmé – cena asi poloviční než klasický standardně vybavený HPLC přístroj, kompaktní velikost umožňující přenosnost systému, velmi jednoduchá konfigurovatelnost a vlastní ovládání (umožňující rychle odstranit problémy). SICrom™ je jednoduché pochopit, jednoduché naprogramovat, jednoduché ovládat, což všechno vede k zrychlení stanovení daných látek [89]. Přístroj je vyráběn firmou FIALab® Instruments, USA a prvotní podklady pro vývoj SICrom™ přístroje byly převzaty z prací publikovaných katedrou analytické chemie FaF UK.



Obrázek 20 - SICrom™ analyzátor [89]

- **další chromatografické trendy v SIA**

Použití monolitických CIM[®] iontoměničových disků pro on line separaci při studii interakcí léčiv a proteinů v séru [90], využití krátkých monolitických kolon v tzv. multisyringe systémech pro stanovení β -laktamových antibiotik [91], zapojení krátkých monolitických kolon do FIA pro stanovení antioxidantů v potravinách [92] a parabenů v kosmetických přípravcích [93].

3.6. Porovnání HPLC a SIC

Sekvenční injekční chromatografie přináší nový směr jak do průtokových metod tak do kapalinové chromatografie a byla díky výsledkům shledána jako metoda srovnatelná s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií pro stanovení látek v jednoduchých směsích. SIC přináší několik výhod i nevýhod oproti HPLC, které jsou stručně popsány v Tabulka 2. SIC přináší možnost on-line použití činidel v jakémkoliv kroku stanovení, spotřeba mobilní fáze, činidel a vzorku je nižší a tím pádem je i nižší tvorba odpadu (vše díky diskontinuálnímu toku), to vše snižuje náklady na jednu analýzu. Dále přináší možnosti variabilní manipulace se zónami kapaliny, kterých není klasická HPLC schopna. Rozměry a přenosnost celého analyzátoru umožňuje jeho použití v terénu tzv. „on field“. Na druhou stranu SIC má několik nevýhod, z nichž lze jmenovat omezenou možnost separace díky možnosti použití pouze krátkých (monolitických) chromatografických kolon a omezeného množství mobilní fáze použitelného pro jednu analýzu (maximálně 5,0 nebo 10,0 ml v závislosti na velikosti pístové pumpy). Také robustnost není tak velká jako u dnes již skoro dokonalých HPLC přístrojů, stejně tak vyhodnocování dat je jednoduché (v současnosti pouze výška píku) na rozdíl od vysoce sofistikovaného programového vybavení moderních HPLC přístrojů.

Tabulka 2 – Porovnání metod HPLC a SIC

Charakteristika	HPLC	SIC	Přínos SIC
Možnost separace	Ano	Ano - jednoduché směsi ^a	Ne
Použití chromatografických kolon	Ano	Pouze krátké monolitické ^b	Ne
Variabilita detekce	Ano	Ano	
Tok mobilní fáze	Kontinuální	Diskontinuální	Ano
Směr toku mobilní fáze	Jeden směr	Obousměrný + zastavení toku	Ano
Rychlost mobilní fáze	Variabilní je možná	Variabilní	
Spotřeba mobilní fáze	Vysoká	Nízká (diskontinuální tok) ^c	Ano
Rychlost analýzy	Průměrná	Průměrná	
Použití činidel (reakcí)	Limitované ^d	Ano	Ano
Předúprava vzorku	Ano (omezená)	Ano	Ano
Automatizace měření	Vysoká	Vysoká	
Robustnost měření	Vysoká	Průměrná ^e	Ne
Zpracování naměřených dat	Sofistikované	Jednoduché	Ne
Reprodukovatelnost	Vysoká	Vysoká	
Cena přístrojového vybavení	Vysoká	Nízká ^f	Ano
Přenosnost přístroje	Ne	Ano ^g	Ano

^a od dvou do pěti látek

^b v současnosti

^c mobilní fáze protéká systémem pouze při měření vzorku

^d post-kolonová derivatizace

^e někdy problémy s vysokým tlakem v systému, omezená délka použitých kolon

^f 2 – 3x levnější

^g malý rozměr přístroje a uzpůsobení k přenášení

4. Rešeršní a experimentální práce

(stručný přehled a popis publikovaných prací)

4.1. Monolitické kolony – nový koncept separace v sekvenční injekční analýze

Dosud byla SIA technika jako neseparační průtoková metoda využívána pro stanovení jednoho analytu, případně celkového obsahu směsi strukturně příbuzných látek (např. parentní látky, degradační produkty a metabolity). Byla ceněna pro možnost automatizovaného a rychlého stanovení v rutinních aplikacích založených na škále chemických derivatizačních reakcí. Postrádala však možnost separace a proto byla opomíjena v některých oblastech analytické praxe. Ve farmaceutické analýze se s požadavkem na separaci setkáváme velice často, ať už při analýze složených léčivých přípravků, při testech stability sledujících rozkladné produkty nebo v oblasti klinických studií, kdy je kromě odstranění složité matrice vzorku třeba rozlišit parentní látky, degradační produkty a případně jejich metabolity.

S vývojem nových chromatografických sorbentů se otevírají možnosti separace i v původně neseparační SIA metodě. Konkrétně se jedná o monolitické kolony, které díky svojí vysoce porézní struktuře kladou minimální odpor průtoku mobilní fáze a v HPLC se využívají k rychlým separacím. Zpětný tlak monolitické kolony je při běžných průtocích schopno překonat i pístové čerpadlo s krokovým motorem a tak kolona může být zapojena do SIA systému jako separační prvek.

Práce přináší nově navrženou metodu pro chromatografickou separaci a stanovení účinných látek a konzervantů v léčivém přípravku. Zapojení krátké komerčně vyráběné monolitické chromatografické kolony s reverzní fází do systému sekvenční injekční analýzy přináší novou možnost stanovení směsných vzorků díky separaci jednotlivých látek před detekcí. Cílem práce bylo vyvinout a otestovat nově sestavený systém a demonstrovat jeho funkčnost na simultánním stanovení čtyř různých látek (methylparabenu, propylparabenu, diklofenaku sodného a vnitřního standardu butylparabenu) v roztocích standardů a léčivém přípravku (Diclofenak HBF emulgel).

Monolitická kolona Chromolith™ Flash RP-18e, 25mm × 4.6mm (Merck®, Německo) a přístroj FIALab® 3000 (FIALab Instruments, USA) s osmicestným selekčním ventilem a pístovou pumpou s 10,0 ml rezervoárem. Detekce byla prováděna spektrofotometricky v průtokové Z cele s 10 mm dlouhou optickou dráhou při 275 nm

(absorpční maximum diklofenaku sodného) DAD detektorem S2000 (Ocean Optics, USA) s deuteriovou lampou D-1000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA).

Tato originální nově vyvinutá metoda byla nazvána sekvenční injekční chromatografie a začala být srovnávána s klasickou vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, která byla použita jako referenční metoda.

Prvním krokem bylo vlastní zapojení monolitické kolony do systému a zjištění možností a omezení, které z toho vyplývaly. Dalším krokem byla optimalizace všech částí a kroků systému (délka a tloušťka hadiček, zásobník mobilní fáze, nádobky na dávkování vzorku, délka detekční cely, délka kolony, použití ochranné předkolony, rychlosti pumpy, dávkovaná množství, atd.).

Monolitická kolona byla zapojena mezi selekční ventil a průtokovou celu detektoru a sestava tak představovala shodné uspořádání jako klasická kapalinová chromatografie.

Během studie byla optimalizována příprava vzorku (extrakce metanolem a centrifugace). Dávkován byl supernatant a upravováno množství vzorku pro jedno měření, rychlost dávkování vzorku, optimalizace složení a pH mobilní fáze, rychlost analýzy (proměnná pro snížení doby analýzy), množství mobilní fáze pro jednu analýzu a výběr vnitřního standardu. Po optimalizaci celého systému a podmínek analýzy byla provedena validace metody a její srovnání s HPLC výsledky. Většinu času zabrala optimalizace složení a pH mobilní fáze, protože se nedařilo dostatečně zachytit methylparaben na koloně a ten eluoval s mrtvým objemem (šum mrtvého objemu částečně překrýval pík methylparabenu). Na druhou stranu mobilní fáze s malou eluční silou by prodlužovala stanovení, které bylo omezeno i celkovým množstvím mobilní fáze použitelné pro analýzu (jedno nasátí pumpy = jejímu objemu 10,0 ml). Během optimalizace byly zkoušena i delší monolitická kolona (50 mm) a to s i bez předkolony (10 mm). Díky použití UV detektoru s diodovým polem bylo testováno použití dvou vlnových délek (absorpční maxima diklofenaku sodného 275 nm a parabenů 256 nm), ale toto nepřineslo významné zvýšení citlivosti měření, takže nakonec byla použita pouze vlnová délka 275 nm. Při analýze byl použit rychlostní gradient (skokový). Díky stabilitě kolony nebyl problém s jejím reekvilibrací ustálením po skokové změně rychlosti. K různým rychlostem bylo přistoupeno pro zlepšení separace – pro methylparaben byla použita nejnižší rychlost ($0,48 \text{ ml min}^{-1}$) pro oddělení píku od šumu

mrtvého objemu, pro propylparaben a vnitřní standard butylparaben byla použita rychlost $0,90 \text{ ml min}^{-1}$ a pro eluci diklofenaku sodného byla použita rychlost $1,20 \text{ ml min}^{-1}$ pro urychlení eluce posledního píku a tím i snížení doby analýzy.

Validační parametry ukázaly velmi dobré výsledky a byly zhodnoceny parametry užívanými pro chromatografické separace. Čas analýzy nepřekročil 8 minut. Metoda byla shledána jako použitelná pro rutinní analýzu diklofenaku sodného a propylparabenu v léčivém přípravku Diclofenac HBF emulgel.

Spojení monolitické kolony se sekvenční injekční analýzou vytváří výborný nástroj pro separaci směsí bez použití HPLC instrumentace s výhodou nižších finančních nákladů a spotřeby organických rozpouštědel.

Výsledky práce byly publikovány v zahraničním impaktovém časopise *Analytica Chimica Acta* (Příloha I).

4.2. Rychlé spektrofotometrické stanovení nafazolin nitrátu a methylparabenu pomocí sekvenční injekční analýzy

Cílem této práce bylo vyvinout metodiku pro stanovení dvou látek (nafazolin nitrátu a methylparabenu) v léčivém přípravku (oční a nosní kapky). Díky jednoduchosti složení (neinterferující pomocné látky) vzorku nebylo třeba jeho složitější předúprava a vzorek byl dávkován do systému po zředění mobilní fází. Byla tak demonstrována schopnost rychlé a jednoduché analýzy léčivého přípravku.

Metoda byla vyvinuta na SIA analyzátoru FIALab[®] 3000 (FIALab[®] Instruments, USA) sestávajícím z pístové pumpy s rezervoárem o objemu 5,0 ml a šesticestného ventilu (Valco Instrument Co., USA) se zapojením monolitické kolony Chromolith[™] Flash RP-18e (25 mm × 4,6 mm) (Merck[®], Německo) s monolitickou předkolonou (5 mm × 4,6 mm) (Merck[®], Německo).

Při optimalizaci metody byly využity zkušenosti z předchozích prací na SIC přístroji a tak byl vývoj zaměřen především na předúpravu vzorku, složení a pH mobilní fáze, nalezení optimálního vnitřního standardu (ethylparaben) a co největší rychlost celé analýzy. Poprvé bylo využito možnosti detektoru s diodovým polem, když byly současně měřeny absorbance při dvou vlnových délkách (220 nm pro nafazolin nitrát a 256 nm pro methylparaben a ethylparaben – vnitřní standard) tím bylo dosaženo zvýšené citlivosti stanovení. Detekce byla prováděna v průtokové Z cele s 10 mm dlouhou optickou dráhou DAD detektorem S2000 (Ocean optics, USA) s deuteriovou lampou D-1000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA). Analýze byl podroben Sanorin[®] 0,5% oční a nosní kapky (IVAX, Česká republika). Délka analýzy nepřekročila 4 minuty. Bylo provedeno i komparativní měření na HPLC jako referenční metodě a následně diskutovány jednotlivé výhody a nevýhody obou metod, kdy se SIC projevila jako dobrá alternativa HPLC. HPLC přístroj pro srovnávací měření se sestával z pumpy LCP 4100 (Ecom, Praha), autosampleru Waters 717 plus, UV detektoru Waters 486 (Waters, Milford, MA) a programu pro vyhodnocování naměřených dat CSW v.1.7 for Windows (Data Apex s.r.o., Praha). Použita byla stejná kolona, mobilní fáze, rychlost průtoku i objem dávkovaného vzorku. Výhody SIC se projeví zejména

úspoře organických rozpouštědel, větší flexibilitou metody, možnosti tzv. stopflow metody, skokové změny rychlosti a obousměrného toku, automatizace celé práce, možnost použít reakčních činidel (post-kolonová derivatizace), mnohem nižší cenou přístroje i analýzy, vysokou rychlostí a prostorovou nenáročností celého přístroje. Z nevýhod lze zmínit zejména omezené možnosti v použití chromatografických kolon, stanovení jednoduchých směsí (2 – 5 látek), nižší robustnost celého přístroje a pouze jednoduchá možnost vyhodnocování naměřených dat.

Výsledky práce byly publikovány v zahraničním impaktivním časopise Talanta (Příloha II).

4.3. Jednoduché stanovení betametasonu a chloramfenikolu v léčivém přípravku za použití krátké monolitické kolony zapojené do systému sekvenční injekční analýzy

Cílem práce bylo vyvinout metodu pro jednoduché simultánní stanovení betametasonu a chloramfenikolu v očních kapkách založenou na chromatografickém stanovení v systému SIA se zapojenou krátkou monolitickou kolonou s reverzní fází Chromolith™ Flash RP-18e, (25 x 4,6 mm) s předkolonou (5 x 4,6 mm)(Merck®, Německo). FIALab® 3000 systém (FIALab®, USA) se šesticestným selekčním ventilem a 5,0 ml pístovou pumpou byl použit jako základ celé metody. Optimalizací prošel výběr mobilní fáze (složení a pH), kdy mobilní fáze s acetonitrem jeví lepší výsledky než při použití methanolu. Nakonec byla použita mobilní fáze acetonitril–voda (30:80, v/v), její průtoková rychlost v systému byla 0,48 ml min⁻¹; UV detekce při dvou vlnových délkách 241 nm a 278 nm, (absorpční maximum betametasonu a chloramfenikolu). Detekce byla prováděna v průtokové Z cele s 10 mm dlouhou optickou dráhou DAD detektorem S2000 (Ocean optics, USA) s deuteriovou lampou D-1000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA). Jako vnitřní standard byl vybrán propylparaben. Délka analýzy nepřesáhla 8 min. Vývoj metody se zaměřil také na předúpravu vzorku léčivého přípravku před vlastní analýzou protože šlo o suspenzi, což znemožňovalo přímý nástřik. Postup byl následující - 500 µl suspenze bylo převedeno do 25,00 ml odměrné baňky; dále bylo přidáno 5,00 ml tetrahydrofuranu, 5,00 ml methanolu, 250 µl koncentrované kyseliny fosforečné a 5,00 ml roztoku vnitřního standardu propylparabenu ($c = 400 \mu\text{g ml}^{-1}$) v methanolu. Směs byla homogenizována a rozpouštěna v ultrazvukové lázni 15 min. K analýze bylo dávkováno 15 µl vzorku. Metoda byla poprvé popsána pro stanovení těchto dvou látek ve směsi nebo každá zvlášť. Výsledky validace byly porovnány s výsledky na HPLC přístroji a shledány použitelnými pro rutinní analýzu všech aktivních složek léčivého přípravku Betabioptal suspenzní oční kapky (Farmila-Thea Farmaceutici S.p.A., Settimo Milanese, Itálie). Podmínky HPLC byly – přístroj se skládal z pumpy LCP 4100 (Ecom, Praha), autosampleru Waters 717 plus, UV detektoru Waters 486 (Waters, Milford, MA) a

programu pro vyhodnocování naměřených dat CSW v.1.7 for Windows (Data Apex s.r.o., Praha). Analýza byla provedena na chromatografické koloně Agilent Zorbax SB-CN 4,6 x 150 mm, velikost částic 5 μ m, mobilní fáze methanol-voda (50:50, v/v), průtoková rychlost 1,0 ml min⁻¹ za laboratorní teploty, vlnová délka detektoru 240 nm.

Výsledky práce byly publikovány v zahraničním impaktivním časopise Journal of Separation Science (Příloha III).

4.4. Nová aplikace monolitické kolony ONYX™ pro simultánní stanovení kyseliny salicylové a triamcinolon acetonidu pomocí sekvenční injekční chromatografie

Pro studii byla poprvé použita nedávno představená komerčně vyráběná monolitická kolona ONYX™ Monolithic C18 (50 x 4,6 mm, Phenomenex®) s 5 mm monolitickou předkolonou a FIALab® 3000 se šesticestným selekčním ventilem a 5,0 ml pístovou pumpou. Práce byla zaměřena na rychlé simultánní stanovení dvou látek v topickém léčivém přípravku. Hlavním problémem bylo desetinásobné množství kyseliny salicylové ve vzorku oproti triamcinolon acetonidu, když zároveň absorpční koeficient triamcinolonu je menší než u kyseliny salicylové, což dále ztěžovalo analýzu. Přesto příprava vzorku k analýze byla poměrně rychle zoptimalizována tak aby se odezva obou látek vešla do detekčního okna UV DAD detektoru. Byla velmi jednoduchá protože topický roztok neobsahuje žádné rušivé pomocné látky a k analýze stačilo pouze zředění (100x) a dávkováno k analýze bylo 10 µl. Pro stanovení tak byla vybrána vlnová délka absorpčního maxima triamcinolonu (240 nm), při této vlnové délce kyselina salicylová nemá žádné ze svých maxim a proto poskytuje menší odezvy. Detekce byla prováděna v průtokové Z cele s 10 mm dlouhou optickou dráhou DAD detektorem S2000 (Ocean optics, USA) s deuteriovou lampou D-1000-CE (Analytical Instrument Systems Inc., USA). Odezva kyseliny salicylové byla nastavena (naředěním vzorku) asi na 80% pracovní škály detektoru, což stále zajišťovalo dostatečné odezvy triamcinolonu nutné pro kvantifikaci. Jako vnitřní standard byl použit propylparaben, který vykazoval optimální výsledky ze zkoušených látek. Při optimalizaci metody byly využity zkušenosti z předchozích prací na SIC přístroji a s monolitickými kolonami Merck®, a tak se práce zaměřila hlavně na předúpravu vzorku, složení a pH mobilní fáze, nalezení optimálního vnitřního standardu (propylparaben) a co největší rychlost celé analýzy. Délka analýzy nepřekročila 5,1 minut. Analýze byl podroben léčivý přípravek Triamcinolon-IVAX kapky na kůži, roztok (IVAX, Česká republika). Bylo provedeno i komparativní měření na HPLC přístroji (Shimadzu, Prominence 20 s DAD detektorem) jako referenční metodě. Podmínky analýzy byly shodné se SIC stanovením

(kolona, mobilní fáze, rychlost mobilní fáze i objem nastříknutého vzorku). Závěrem práce bylo zrevidováno srovnání metody SIC a HPLC, které ukazuje metodu SIC jako srovnatelnou alternativu HPLC.

Výsledky práce byly zaslány k publikaci v zahraničním impaktovém časopise Talanta (Příloha IV).

4.5. Přehled sekvenční injekční chromatografie a její aplikace ve farmaceutické analýze

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je novou generací sekvenční injekční analýzy a konsolidovala se jako vhodná alternativa klasické HPLC pro analýzu jednoduchých směsí. Přínosem je automatizace, miniaturizace a nízká spotřeba vzorku, činidel a rozpouštědel – tím pádem i nízká produkce odpadu. Zapojení krátké monolitické chromatografické kolony otvírá novou možnost on-line chromatografické separace směsných vzorků. V přehledu je prezentován potenciál SIC, srovnání SIC a HPLC pro stanovení jednoduchých směsí (farmaceutických přípravků) a popsány poslední trendy v separaci v průtokových metodách. Zmíněny jsou i jiné neseparační techniky pro stanovení směsí pomocí průtokových metod (selektivní reakce, selektivní detektory, extrakce, atd.).

Shrnuty jsou metody SIC pro stanovení kapalných (roztoky a kapky), polotuhých (masti a krémy) a pevných (tablety a kapsle) léčivých přípravků. Popsán je i systém pro automatické sledování in vitro uvolňování (disoluce) účinných látek z polotuhého léčivého přípravku.

Výsledky práce byly zaslány k publikaci v zahraničním impaktivém časopise *Analytica Chimica Acta* (Příloha V).

5. Přílohy

5.1. Publikované články

1. D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček: Monolithic columns - a new concept of separation in the sequential injection technique, *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) 205 – 214.
2. P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography, *Talanta* 70 (2006) 408 - 413.
3. D. Šatínský, P. Chocholouš, M. Salabová, P. Solich: Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to sequential injection technique, *J. Sep. Sci.* v tisku.
4. P. Chocholouš, P. Holík, D. Šatínský, P. Solich: A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography, *Talanta* zasláno k tisku.
5. P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský: An overview of Sequential injection chromatography and its applications in pharmaceutical analysis, *Anal. Chim. Acta* zasláno k tisku.

5.2. Přednášky a postery uvedené ve sbornících

1. P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Využití monolitických kolon k separaci v nízkotlakých průtokových systémech. IX.sjezd České farmaceutické společnosti, Zlín, 13. - 15. 5. 2004.
2. J. Huclová, D. Šatínský, P. Chocholouš, R. Karlíček: On-line spojení extrakce na pevnou fázi a sekvenční injekční analýzy pro stanovení léčiv v biologickém materiálu. IX.sjezd České farmaceutické společnosti, Zlín, 13. - 15. 5. 2004.
3. P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Stanovení nafazolinu, antazolinu a methylparabenu v očních kapkách Sanorin-analergin[®] pomocí sekvenční injekční chromatografie. 33. Konference Syntéza a analýza léčiv, Nitra, Slovensko, 9.9 - 11. 9. 2004.
4. J. Huclová, D. Šatínský, P. Chocholouš, R. Karlíček: Úprava vzorku biologického materiálu a stanovení léčiv pomocí kombinace SIA-SPE. 33. Konference Syntéza a analýza léčiv, Nitra, Slovensko, 9. - 11. 9. 2004.
5. P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Stanovení Nafazolin nitrátu a methylparabenu v nosních kapkách Sanorin[®] 0,5%o metodou sekvenční injekční chromatografie. 34. Konference Syntéza a analýza léčiv, Brno, 12. – 14. 9. 2005.
6. P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský: Determination of naphazoline nitrate and methylparaben in nasal drops using sequential injection chromatography, IMA 2005, Iraklion, Kréta, Řecko, 2. – 6. 10. 2005.
7. M. Salabová, D. Šatínský, P. Chocholouš, P. Solich: Simultaneous determination of betamethasone and chloramphenicol in pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to sequential injection system, IMA 2005, Iraklion, Kréta, Řecko, 2. – 6. 10. 2005.
8. P. Chocholouš, D. Šatínský, M. Salabová, P. Solich: Sequential injection chromatography – a novel practical tool in instrumental methods of analysis, X. Flow analysis, Porto, Portugalsko, 3. – 8. 9. 2006.
9. P. Chocholouš, P. Holík, D. Šatínský, P. Solich: Sequential injection chromatography for simultaneous determination of triamcinolone acetonide and salicylic acid in a topical solution, X. Flow analysis, Porto, Portugalsko, 3. – 8. 9. 2006.

10. P. Solich, D. Šatínský, P. Chocholouš, R. Karlíček: Application of Sequential Injection Chromatography in pharmaceutical area, X. Flow analysis, Porto, Portugalsko, 3. – 8. 9. 2006.
11. P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Sekvenční injekční chromatografie (SIC) – nový směr v průtokových metodách, 35. Konference Syntéza a analýza léčiv, Velké Karlovice, 12. – 15. 9. 2006. - přednáška
12. P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský: Use of sequential injection chromatography in analysis of pharmaceutical preparations, Joint meeting 2006, Marburg, Německo, 4. – 7. 10. 2006.

5.3. Příloha I. - D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček: Monolithic columns - a new concept of separation in the sequential injection technique, Anal. Chim. Acta 499 (2003) 205 – 214.

5.4. Příloha II. - P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich: Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography, Talanta 70 (2006) 408 - 413.

5.5. Příloha III. - D. Šatínský, P. Chocholouš, M. Salabová, P. Solich: Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to sequential injection system, J. Sep. Sci. 29 (2006) v tisku.

5.6. Příloha IV. - P. Chocholouš, P. Holík, D. Šatínský, P. Solich: A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography, Talanta zasláno k tisku.

**5.7. Příloha V - P. Chocholouš, P. Solich, D. Šatínský:
An overview of Sequential Injection
Chromatography and its applications in
pharmaceutical analysis, Anal. Chim. Acta zasláno k
tisku.**

5.8. Přílohy VI – XVI (Přednášky a postery uvedené ve sbornících)

Stanovení nafazolinu, antazolinu a metylparabenu v očních kapkách Sanorin-analergin[®] pomocí sekvenční injekční chromatografie

PETR CHOCHOLOUŠ¹, DALIBOR ŠATÍNSKÝ^{1,2}, PETR SOLICH^{1,2}

¹ Katedra analytické chemie, ² Centrum LN00B125, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Česká republika, email: chocholous@faf.cuni.cz

Sekvenční injekční chromatografie (SIC) je originální metoda vytvořená na katedře analytické chemie FaF UK v Hradci Králové v roce 2002. Spojení metody SIA s monolitickou kolonou vnáší prvek separace do jednoduchých průtokových metod a tím rozšiřuje jejich uplatnění při stanovení látek ve vícesložkových vzorcích. Od svého vzniku prošla metoda vývojem a byla použita pro simultánní stanovení látek v několika léčivých přípravcích.

Sanorin-Analergin[®] oční a nosní kapky obsahují dvě léčivé látky nafazolin nitrát (vasokonstriční sympatomimetikum) a antazolin mesilát (kompetitivní H1 antihistaminikum). Přípravek se užívá při senné rýmě, vasomotorické rýmě a při alergických zánětech spojivek a víček.

Metodou SIC jsou v jednom kroku stanovovány obě léčivé látky i konzervans methylparaben. K separaci je používána monolitická kolona Merck[®] Chromolith[™] Flash RP-18e o délce 25 mm. Hlavní problematikou celého stanovení bylo nalézt optimální podmínky pro separaci a následné stanovení tří látek a vnitřního standardu s využitím spektrofotometrické detekce v UV oblasti. Protože kapky mají velmi jednoduché složení s minimem pomocných látek, nastříkují se bez nutnosti předchozí extrakce stanovovaných látek (kapky se pouze zředí). Jedná se o první aplikaci metody SIC pro stanovení látek v na očních a nosních kapkách.

Práce vznikla za finanční podpory MŠMT, Výzkumného záměru MSM 111600001 a výzkumného Centra LN00B125.

6. Shrnutí

Předložená práce přináší rozšíření aplikací sekvenční injekční analýzy v oblasti farmaceutické analýzy. Zabývá se možnostmi chromatografie pro úpravu vzorku před vlastním stanovením analytu. Soustředí se na zapojení monolitických kolon v systému SIA umožňujících provádět simultánní stanovení několika látek a analyzovat tak vzorky s maticí nebo jednoduchých směsí (farmaceutické přípravky). Nově vytvořená metoda je nazývána sekvenční injekční chromatografie (SIC) a představuje další generaci průtokových metod.

Zapojením krátké monolitické kolony vyznačující se nízkým zpětným tlakem do SIC systému vyústilo v zavedení separačního prvku do dosud neseparační průtokové metody. Komerčně vyráběné monolitické kolony s reverzní fází se jeví jako vhodné pro stanovení léčiv ve směsných léčivých přípravcích. SIC umožňuje velmi rychlé stanovení směsných vzorků bez nebo jen s minimální předchozí off-line úpravou. Analýza vzorků s komplikovanější maticí (krémy, masti) byla provedena po provedení extrakce rozpouštědlem ze vzorku. Bylo také studováno využití různých délek monolitických kolon.

První experimentální práce (příloha I) byla první prací na SIC systému jejíž cílem byla bezproblémová implementace monolitické kolony a následné otestování na léčivém přípravku (mast). Byly optimalizovány jednotlivé součásti systému k práci za vyšších pracovních tlaků a k použití organických rozpouštědel a vybraných vzorků. Před vlastní analýzou musela být provedena úprava vzorku extrakcí do methanolu. Pro urychlení celé analýzy byl proveden skokový gradient zvyšování rychlosti průtoku mobilní fáze. Srovnání naměřených výsledků ukázalo, že SIC je dobrou alternativou HPLC pro stanovení jednoduchých směsí s několika výhodami i nevýhodami.

Druhá experimentální práce (příloha II) byla zaměřena na vyvinutí jednoduché a rychlé metody pro stanovení dvou látek (nafazolin nitrátu a methylparabenu) v léčivém přípravku Sanorin® 0,5% oční a nosní kapky. Využity byly zkušenosti z předchozích prací na SIC přístroji a vývoj byl zaměřen především na předúpravu vzorku, složení a pH mobilní fáze, nalezení optimálního vnitřního standardu (ethylparaben) a co největší rychlost celé analýzy. Citlivost stanovení byla zvýšena použitím dvou vlnových délek pro měření v absorpčním maximu stanovovaných látek. Vzorek kapek nebylo třeba před

analýzou upravovat (kromě zředění mobilní fáze) což přispělo ke krátkému celkovému času analýzy. Na závěr byly výsledky ověřeny srovnávacím měřením na HPLC za shodných chromatografických podmínek.

V třetí experimentální práci (příloha III) byla vyvinuta metoda pro simultánní stanovení betametasonu a chloramfenikolu v suspenzních očních kapkách Betabioptal. Vývoj metody se kromě optimalizace vlastního stanovení také zaměřil na předúpravu vzorku léčivého přípravku před vlastní analýzou. Protože šlo o suspenzi nebyl možný přímý nástřik. Výsledky validace byly porovnány s výsledky metody vyvinuté na HPLC přístroji a shledány použitelnými pro rutinní analýzu všech aktivních složek léčivého přípravku.

Cílem čtvrté experimentální práce (příloha IV) bylo vyvinout SIC metodu poprvé s využitím monolitické kolony ONYX™ Monolithic C18 pro stanovení kyseliny salicylové a triamcinolonu acetonidu v topickém léčivém přípravku. Příprava vzorku byla velmi jednoduchá, protože pomocné látky neruší detekci. K analýze stačilo pouze zředění vzorku mobilní fází, aby odezvy obou látek na UV detektoru byly v pracovním rozmezí detektoru (kys. salicylové je v roztoku 10x více než triamcinolon acetonidu). Bylo provedeno i komparativní měření na HPLC přístroji s DAD detektorem (za shodných chromatografických podmínek).

Rešeršní práce (příloha V) byla zaměřena na přehled všech SIC metod vyvinutých na Katedře analytické chemie od jejího vzniku, její srovnání s klasickou HPLC. Kriticky byly zhodnoceny výhody a nevýhody SIC. Poslední trendy v separaci v nízkotlakých průtokových systémech rozvíjené na zahraničních pracovištích ukazují na úspěšný rozvoj tohoto směru.

7. Závěr

Zapojení monolitické kolony přináší nový směr do stále populárnější SIA metody (více než 100 opublikovaných prací využívající SIA za posledních 12 měsíců) [94]. Sekvenční injekční chromatografie je slibně se rozvíjející metoda rozšiřující možnosti průtokových i separačních metod. Tato technika je charakteristická svým jednoduchým a dostatečně robustním systémem, vysokou variabilitou, snadnou automatizovatelností, miniaturizací, možností on-line reakcí probíhajících přímo v systému, širokou nabídkou detekčních technik pro stanovení a dostatečně vysokou frekvencí dávkování vzorků. Výhodou jsou také nízké ekonomické nároky jak na aparaturu, kterou lze jednoduše sestavit jak z jednotlivých součástí [95, 96] i komerčně dostupnou, tak na chemická činidla a rozpouštědla. Nyní se k těmto výhodám přidává ještě možnost on-line separace jednoduchých směsí.

Možnost uplatnění SIC ve farmacii se vztahuje nejen na kontrolu kvality a účinnosti léčiv (screening vzorků, např. při monitorování výrobních procesů - vstupní, mezioperační a výstupní kontrola), ale také na hodnocení deštrujících stabilitních studií. Ve výrobní technologii pomáhá zjišťovat stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy – disoluční a liberační testy (spojení s Franzovou celou). On-line úprava vzorků otevírá pro techniku SIA také možnost uplatnění ve screeningu vzorků biologického materiálu. V neposlední řadě je pak velmi praktická i možnost monitorování kinetických studií daných chemických reakcí (stop-flow analysis).

Začleněním monolitické kolony byla odstraněna jedna z nevýhod SIA metody, a to její neseparační charakter, který primárně znemožňoval její použití pro stanovení látek ve směsných vzorcích bez předúpravy vzorku. Chromatografický přístup v neseparačních nízkotlakých průtokových metodách našel od svého vzniku další uplatnění v řadě prací publikovaných v odborné literatuře.

Výsledky této disertační práce představují praktickou aplikaci SIC systému v kontrole farmaceuticky významných látek v léčivých přípravcích. Získané výsledky, které jsou srovnatelné s lékopisnými metodami stanovení měřených látek, naznačují možnosti využití SIC v dalších oblastech analytické praxe.

Komerční výroba přístroje SICrom™ (FIALab® Instruments, USA), která vychází z našich výsledků poukazuje na další možnosti rozšíření chromatografické separace v nízkotlakých průtokových metodách [89].

8. Summary

This work brings extending of applications of sequential injection analysis in area of pharmaceutical analysis. It is focused on integration of monolithic columns into SIA system that enables simultaneous determination of few analytes in samples with matrix (biologic samples) or simple mixtures (pharmaceutical preparations). A new created method was called Sequential Injection Chromatography (SIC) and represents a new generation of flow methods.

Integration of short monolithic column with low back-pressure leads into creation of low pressure flow separation method. Commercially produced monolithic columns with reverse phase sorbent C18 are suitable for determination of active compounds and adjuvants in pharmaceutical preparations. This enables fast determination of samples without or only with simple off-line pre-treatment of sample. Employment of various lengths of monolithic columns used in SIC was studied.

First experimental work (appendix I) was first SIC experiment. The aim of it was trouble-free connection of monolithic column with SIA manifold and application on determination of pharmaceutical preparation Diclofenac HBF emulgel (ointment contains diclofenac nitrate, methylparaben and propylparaben). All parts of system were optimized for higher work pressure. Sample of ointment was pre-treated (extracted into methanol) before analysis. Gradient of flow speed of mobile phase was used for decreasing of time of whole analysis. Comparison of results with HPLC showed that SIC is good alternative method for determination of simple mixtures.

Second experimental work (appendix II) was focused on developing of simple and fast method for determination of two analytes in Sanorin[®] 0.5‰ (nasal and eye drops - contain naphazoline nitrate and methylparaben). Experience from previous works was used so that mainly pre-treatment of sample, mobile phase and internal standard were optimized. Only dilution with mobile of drops was done before measurement because adjuvants did not interfere. Sensitivity of determination was increased by use of two wavelengths for measuring in absorption maximum of both analytes. Results were compared with HPLC results under same chromatographic conditions.

Third experimental work (appendix III) deals about developing of method for simultaneous determination of betametasone and chloramphenicol in eye drops Betabioptal. Development was focused except chromatographic conditions on pre-treatment of sample – suspension eye drops. Results of validation were compared with method developed in HPLC (different chromatographic conditions) and were gather suitable for routine analysis of all active compounds of pharmaceutical preparation.

The aim of fourth experimental work (appendix IV) was to develop SIC method with OnyxTM Monolithic C18 column. Both active substances of Triamcinolon-IVAX (topical solution - contains triamcinolon acetonide and salicylic acid) were determined. Pre-treatment of sample before analysis was very fast (only diluting with mobile phase) because adjuvants did not interfere. Concentration of triamcinolon acetonide in sample was ten time less than concentration of salicylic acid so only one wavelength (absorbance of triamcinolon acetonide) was used for adequate response. Results were compared with HPLC results under same chromatographic conditions.

Review work (appendix V) is an overview of all SIC works created in Department of analytical chemistry and comparison with HPLC. Advantages and disadvantages of SIC method were critically evaluated. Recent trends in flow methods show that separation in low pressure flow methods is hopefully developing area of analytical chemistry.

Number of published papers works show SIC like good alternative of HPLC for determination of simple mixtures (contain 2 – 5 analytes) ideal for drug control, drug efficiency and long time stability studies.

9. Seznam literatury

- ¹ Růžička J.: Flow Injection – CD, the 2nd edition 2002.
- ² <http://www.flowinjection.com/> - FIA tutorial - 08/2006.
- ³ Karlíček R.: Česk. farm. 5 (1982) 190.
- ⁴ Růžička J., Hansen H.: Flow Injection Analysis, John Wiley & Sons, New York, 1981.
- ⁵ Valcarel M., Luque de Castro M. D., Flow-injection analysis: principles and applications, Ellis Horwood Ltd., Chichester, 1987.
- ⁶ Paseková H., Disertační práce: Využití automatizovaných průtokových metod ve farmaceutické analýze, FaF UK, kat. analytické chemie, 2001.
- ⁷ Růžička J., Marshall G.: Anal. Chim. Acta 237 (1990) 329.
- ⁸ Paseková H., Polášek M., Solich P.: Chemické listy 93 (1999) 354.
- ⁹ Van Staden J. F., du Plesses H., Taljaard R. E.: Anal. Chim. Acta 357 (1997) 141.
- ¹⁰ Peterson K. L., Logan B. K., Christian G. D.: Růžička J., Anal. Chim. Acta 337 (1997) 99.
- ¹¹ Wu C.-H., Scampavia L., Ruzicka J., Zamost B., Analyst 126 (2001) 291.
- ¹² Růžička J.: Anal. Chim. Acta 308 (1995) 14.
- ¹³ Růžička J.: Analyst 125 (2000) 1053.
- ¹⁴ Garden S.R., Strachan N.J.C.: Anal. Chim. Acta 444 (2001) 187.
- ¹⁵ Dreveny D., Michalowski J., Seidel R., Gubitz G.: Analyst (Amsterdam) 123 (1998) 2271.
- ¹⁶ Wang J., Růžička J.: TrAC 22 (2003) 225.
- ¹⁷ Huclová J., Karlíček R.: Chem. Listy 97 (2003) 246.
- ¹⁸ Nováková L., Disertační práce: Vývoj a validace HPLC metod pro analýzu biologicky aktivních látek s využitím nových stacionárních fází, FaF UK, kat. analytické chemie, 2005.
- ¹⁹ Calatayud J.M.: Flow injection analysis of pharmaceuticals, Taylor and Francis, London 1996.
- ²⁰ Meloan C.E., Chemical Separations, Principles, Techniques and Experiments, John Wiley and Sons, 1999.
- ²¹ Smith R.M.: J. Chromatogr. A 1000 (2003) 3.
- ²² Huclová J., Šatínský D., Pavlíček O., Vedralová L., Karlíček R., Analytica Chimica Acta 573 (2006) 376.
- ²³ Economou A., TrAC 24 (2005) 416.
- ²⁴ Český lékopis 2005 (ČL 2005), Grada Publishing a. s., 2005, separační metody (2.2.46), 177.
- ²⁵ <http://sweb.cz/HPLC/> - 08/2006.
- ²⁶ Snyder L.R., Kirkland J.J., Glajch J.L., Practical HPLC Method Development, John Wiley and Sons, 1997.
- ²⁷ <http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html> - 08/2006.
- ²⁸ Willard H.H., Merritt, Jr. L.L., Dean J.A., Settle, Jr. F.A., Instrumental Methods of Analysis, Waldsworth Publishing Company, Belmont, California, 1988.

- ²⁹ Skoog D.A., West D.M., Holler F.J., Rouch S.R., Fundamentals of Analytical Chemistry, Thomson Brooks/Cole, USA, 2004.
- ³⁰ http://hplc.chem.shu.edu/NEW/HPLC_Book/ (Kazachevich Y., McNair H., Textbook on High Performance Liquid Chromatography).
- ³¹ <http://www.chromolith.com> – 08/2006.
- ³² Hjertén S., Liao J.L., Zhang R.: J. Chromatogr. 473 (1989) 273.
- ³³ Švec F., Chem. Listy, 98 (2004) 232.
- ³⁴ Fields S.M.: Anal. Chem. 68 (1996) 2709.
- ³⁵ Minakuchi H., Nakanishi K., Soag N., Ishizuka N., Tanaka N.: Anal. Chem. 68 (1996) 3498.
- ³⁶ Podgornik A., Jančar J., Merhar M., Kozamernik S., Glover D., Čuček K., Barut M., Štrancar A.: J. Biochem. Bioph. Meth. 60 (2004) 179.
- ³⁷ Barbarin N., Mawhinney D.B., Black R., Henion J.: J. Chromatogr. B 783 (2003) 73.
- ³⁸ Rocheleau M.J., Jean C., Bolducand J., Carazzato D.: J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 191.
- ³⁹ Pihlainen K., Sippola E., Kostiainen R.: J. Chromatogr. A 994 (2003) 93.
- ⁴⁰ Garrido J.L., Rodríguez F., Campaña E., Zapata M.: J. Chromatogr. A 994 (2003) 85.
- ⁴¹ Chen Z., Niitsuma M., Uchiyama K., Hobo T.: J. Chromatogr. A 990 (2003) 75.
- ⁴² Kato M., Jin H., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., Dulay M.T., Zare R.N.: J. Chromatogr. A 1004 (2003) 209.
- ⁴³ Hoegger D., Freitag R.: J. Chromatogr. A 1004 (2003) 195.
- ⁴⁴ Bandilla D., Skinner C.D.: J. Chromatogr. A 1004 (2003) 167.
- ⁴⁵ Xie S., Jiang T., Švec F., Allington R.W.: Solid phase extraction, 687-697 in Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z.: Monolithic materials, Journal of Chromatography Library, Vol. 67, Elsevier Science B.V., Amsterdam 2003.
- ⁴⁶ Jungbauer A., Hahn R.: Catalysts and enzyme reactors, 699-724 in Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z.: Monolithic materials, Journal of Chromatography Library, Vol. 67, Elsevier Science B.V., Amsterdam 2003.
- ⁴⁷ Jungbauer A., Pfliegerl K.: Solid phase synthesis and auxiliaries for combinatorial chemistry, 726-743 in Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z.: Monolithic materials, Journal of Chromatography Library, Vol. 67, Elsevier Science B.V., Amsterdam 2003.
- ⁴⁸ Zou H., Huang X., Ye M., Luo Q.: J. Chromatogr. A 954 (2002) 5.
- ⁴⁹ Iberer G., Hahn R., Jungbauer A.: LC-GC 17 (1999) 1001.
- ⁵⁰ Tanaka N., Kobayashi H., Ishizuka N., Minakuchi H., Nakanishi K., Hosoya K., Ikegami T., J. Chromatogr. A 965 (2002) 35.
- ⁵¹ Minakuchi H., Nakanishi K., Soga N., Ishizuka N., Tanaka N., J. Chromatogr. A 762 (1997) 135.
- ⁵² Dulay M.T., Quitino J.P., Benhett B.D., Zare R.N., J. Sep. Sci. 25 (2002) 3.
- ⁵³ Hebb A.K., Senco K., Cooper A.I., Composites Science and Technology 63, 16 (2003) 2379-2387.
- ⁵⁴ Lämmerhofer M., Svec F., Fréchet J.M.J., Linder W., J. Chromatogr. A 925 (2001) 265.
- ⁵⁵ Kato M., Sakai-Kato K., Toyo'oka T., Dulay M. T., J. Chromatogr. A 961 (2002) 45.

-
- ⁵⁶ Bedair M., Rassi Z.E., *J. Chromatogr. A* 1013 (2003) 35.
- ⁵⁷ Hoegger D., Freitag R., *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 211.
- ⁵⁸ Huang X., Zhang S., Schulz G.A., Henion J., *Anal. Chem.* 74 (2002) 2336.
- ⁵⁹ Švec F., Tennikova T.B., Deyl Z. (Editors), *Monolithic materials-preparation, properties and application*, Elsevier 2003.
- ⁶⁰ Sun X., Chai Z., *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 209.
- ⁶¹ Chen Z., Uchiyama K., Hobo T., *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 83.
- ⁶² Janco M., Xie S.F., Peterson D.S., Allington R.W., Švec F., Frechet J.M.J., *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 909.
- ⁶³ Coufal P., Cihak M., Suchankova J., Tesarova E., Bosakova Z., Stulik K., *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 99.
- ⁶⁴ Shediak R., Ngola S.M., Throckmorton D.J., Anex D. S., Shelpodd T. J., Anup K., *J. Chromatogr. A* 925 (2001) 251.
- ⁶⁵ Zhang S., Zhuang J., Horváth C., *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 189.
- ⁶⁶ <http://www.biaseparations.com/documents/products/cimdisks.asp> - 09/2006.
- ⁶⁷ Šatínský D., Solich P., Chocholouš P., Karlíček R., *Anal. Chim. Acta*, 499 (2003) 205.
- ⁶⁸ Šatínský D., Huclová J., Solich P., Karlíček R., *J. Chromatogr. A*, 1015 (2003) 239.
- ⁶⁹ Huclová J., Šatínský D., Karlíček R., *Anal. Chim. Acta*, 494 (2003) 133.
- ⁷⁰ Klimundová J., Šatínský D., Sklenářová H., Solich P., *Talanta*, 69 (2006) 730.
- ⁷¹ Šatínský D., Neto I., Solich P., Sklenářová H., Montenegro M.C., Araújo A.N., *J. Sep. Sci.*, 27 (2004), 529.
- ⁷² Šatínský D., Santos L., Sklenářová H., Solich P., Montenegro M.C., Araújo A.N., *Talanta*, 68 (2005) 214.
- ⁷³ Šatínský D., Huclová J., Ferreira R.L.C., Montenegro M.C., Solich P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 40 (2006) 293.
- ⁷⁴ Zisiou E.P., Pinto P.C.A.G., Saraiva M.L.M.F.S., Siquet C., Lima J.L.F.C., *Talanta*, 68 (2005) 226.
- ⁷⁵ Min R.W., Nielsen J., Villadsen J., *Anal. Chim. Acta*, 320 (1996) 199.
- ⁷⁶ Santos E., Araújo A., Couto C., Montenegro M.C., Kejzlarová A., Solich P., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (2004) 701.
- ⁷⁷ Chisvert A., Vidal M.T., Salvador A., *Anal. Chim. Acta*, 464 (2002) 295.
- ⁷⁸ LeThanh H., Lendl B., *Anal. Chim. Acta*, 422 (2000) 63.
- ⁷⁹ Huclová J., Šatínský D., Maia T., Karlíček R., Solich P., Araújo A., *J. Chromatogr. A*, 1087 (2005) 245.
- ⁸⁰ Burakham R., Lapanantnoppakhun S., Jakmune J., Grudpan K., *Talanta*, 68 (2005) 416.
- ⁸¹ Cerdà A., Oms M.T., Forteza R., Cerdà V., *Anal. Chim. Acta*, 371 (1998) 63.
- ⁸² Legnerová Z., Solich P., Sklenářová H., Šatínský D., Karlíček R., *Water Res.*, 36 (2002) 2777.
- ⁸³ Oms M.T., Cerdà A., Cladera A., Cerdà V., Forteza R., *Anal. Chim. Acta*, 318 (1996) 251.
- ⁸⁴ da Silva J.E., Pimentel M.F., da Silva V.L., Montenegro M.C., A. Araújo, *Anal. Chim. Acta*, 506 (2004) 197.

-
- ⁸⁵ Ohno S., Teshima N., Sakai T., Grudpan K., Polášek M., *Talanta*, 68 (2006) 527.
- ⁸⁶ Long X., Hansen E.H., Miró M., *Talanta*, 66 (2005) 1326.
- ⁸⁷ de Oliveira F.S., Korn M., *Talanta*, 68 (2006) 992.
- ⁸⁸ Pasamontes A., Callao M.P., *Trends Anal. Chem.*, 25 (2006) 77.
- ⁸⁹ <http://www.sichrom.com> – 08/2006.
- ⁹⁰ Zacharis C., Theodoridis G., Podgornik A., Voulgaropoulos A., *J. Chromatogr. A*, 1121 (2006) 46.
- ⁹¹ González-San Miguel H.M., Cerdá-Martín V., sborník konference X International Conference on Flow Analysis, 3. – 8. 9. 2006, Porto, Portugalsko, P19.
- ⁹² García-Jiménez J.F., Capitán-Vallvey L.F., Valencia M.C., sborník konference X International Conference on Flow Analysis, 3. – 8. 9. 2006, Porto, Portugalsko, P170.
- ⁹³ Laver J.B., Mirón M.C.V., Capitán-Vallvey L.F., sborník XIITH International symposium on Luminescence spektrometry, 18. – 21. 7. 2006, Lugo, Španělsko, PO 72.
- ⁹⁴ <http://portal.isiknowledge.com/> - klíčové slovo sequential injection analysis – 09/2006.
- ⁹⁵ Solich P., Svoboda A., Sklenářová H., Polášek M., Karlíček R., *Instrum. Sci. Technol.* 30 (2002) 13.
- ⁹⁶ ČSN EN ISO 13395, Jakost vod – Stanovení dusitanového dusíku a dusičnanového dusíku a sumy obou průtokovou analýzou (CFA a FIA) se spektrofotometrickou detekcí, Český normalizační institut, 1997.