

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie

SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA BI - LOV

–

VÝVOJ TECHNIKY PRO ÚPRAVU VZORKU EXTRAKCÍ NA TUHOU FÁZI I

Diplomová práce

Vedoucí práce: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Mgr. Lenka Popovská

Prohlášení

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne 26. 3. 2016

.....

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za jeho vstřícnost, trpělivost, cenné rady a připomínky, díky kterým mohla být tato práce sepsána.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Lenka Popovská

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: Sekvenční injekční analýza BI - LOV - vývoj techniky pro úpravu vzorku extrakcí na tuhou fázi I

Antioxidační vlastnosti fenolických látek mohou pozitivně ovlivňovat terapii a prevenci nemocí spojených s oxidačním stresem, jako jsou např. maligní onemocnění, ateroskleróza a kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní choroby (Alzheimerova a Parkinsonova nemoc), revmatoidní artritida, virová onemocnění, počínající benigní hyperplazie prostaty (BHP), prostatitida aj.

Tato práce se věnuje analýze fenolických kyselin, především kyselině ferulové, částečně pak také kyselině protokatechové a *o*-kumarové.

Kyselina ferulová byla odzkoušena v pěti koncentracích (10,000 $\mu\text{g/ml}$, 5,000 $\mu\text{g/ml}$, 2,500 $\mu\text{g/ml}$, 1,250 $\mu\text{g/ml}$ a 0,625 $\mu\text{g/ml}$), na čtyřech různých aniontově výměnných sorbentech (TMAHP, QAE - A25, SAX - BOND a SAX - DSC), při čtyřech různých pH (5,0, 6,0, 7,0 a 8,5) promývacího pufru a třech různých pH (1,5, 2,0 a 2,5) pufru elučního, a byla sledována její absorpance při vlnových délkách 325 a 240 nm.

Dále byla hodnocena manipulace s jednotlivými sorbenty, především praktická stránka jejich použití ve formátu LOV (laboratoř na ventilu).

Po celkovém zhodnocení všech čtyřech sorbentů při různých podmínkách měření byly určeny jako nejlepší sorbenty SAX - BOND a QAE - A25 a jako nejvhodnější podmínky pro další analýzu pH promývacího pufru 5,0 a pH elučního pufru 1,5.

Abstract

Charles University in Prague
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Analytical chemistry

Candidate: Mgr. Lenka Popovská

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of diploma thesis: Sequential injection analysis BI - LOV - development of
technique for sample treatment using solid phase extraction I

Antioxidant activity of polyphenolic compounds can positively affect the therapy and the prevention of diseases associated with oxidative stress, e.g. cardiovascular diseases, atherosclerosis, neurodegenerative diseases (Alzheimer's and Parkinson's diseases), rheumatoid arthritis, virus diseases, neoplasms, benign prostatic hyperplasia (BHP), prostatitis etc.

This diploma thesis deals with the analysis of phenolic acids, namely ferulic acid and also protocatechuic acid and *o*-coumaric acid.

The ferulic acid was analysed within five concentrations (10,000 µg/ml, 5,000 µg/ml, 2,500 µg/ml, 1,250 µg/ml and 0,625 µg/ml), four different strong anion exchangers (TMAHP, QAE - A25, SAX - BOND and SAX - DSC), five different pH (5,0, 6,0, 7,0 a 8,5) of washing buffer and three different pH (1,5, 2,0 a 2,5) of elution buffer. Absorbance of the ferulic acid was measured at wavelengths 325 and 240 nm.

In this thesis was also assessed handling with each sorbent, especially convenient use within LOV (Lab On Valve) format.

After overall assessment of all four sorbents within various conditions of analysis were chosen two suitable sorbents – SAX - BOND and QAE - A25, and were chosen appropriate conditions for the future research - pH of washing buffer 5,0 and pH of elution buffer 1,5.

Obsah

Abstrakt	4
Abstract	5
Seznam obrázků	8
Seznam tabulek	10
Seznam zkratk	11
1 Úvod	12
2 Cíl	13
3 Teoretická část	14
3.1 FENOLICKÉ KYSELINY	14
3.2 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA A PŘÍBUZNÉ TECHNIKY	16
3.2.1 Schéma přístroje	16
3.2.2 Princip.....	17
3.2.3 Mísení pomocí disperze	18
3.2.4 Základní procesy, na kterých jsou založeny průtokové injekční techniky.....	19
3.2.5 Dvojité píky.....	19
3.2.6 Maximalizace citlivosti procesu	21
3.2.7 Průtoková rychlost programovatelná vs. konstantní	21
3.2.8 Aplikace	23
3.2.9 Přístroj	23
3.2.10 Komponenty.....	24
3.3 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA	25
3.3.1 Princip a vlastnosti metody SIA; srovnání s technikou FIA	25
3.3.2 Schéma přístroje	26
3.3.3 Uplatnění SIA v praxi	29
3.4 TECHNIKY ZALOŽENÉ NA MIKROČÁSTICÍCH.....	30
3.4.1 Materiál.....	31
3.4.2 Schéma přístroje pro BI analýzu ve formátu LOV	33
3.4.3 Možné problémy u BI techniky	34
3.4.4 Aplikace BI technik	34
3.5 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRRAFIE	37
3.5.1 Princip.....	37
3.5.2 Přístroj a materiál.....	38
3.5.3 Porovnání SIC a kapalinové chromatografie	39

3.5.4	Další varianty SIC	40
3.6	EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI	42
3.6.1	Sorbenty	44
4	Praktická část	51
4.1	PŘÍSTROJE A POMŮCKY	51
4.2	CHEMIKÁLIE	52
4.3	CHARAKTERISTIKA SORBENTŮ	53
4.3.1	Charakteristika sorbentu Sephadex QAE - A25	53
4.3.2	Charakteristika sorbentu Discovery DSC - SAX SPE	53
4.3.3	Charakteristika sorbentu AccuBOND[II] SAX	53
4.3.4	Charakteristika sorbentu Iontosorb TMAHP 100	54
4.4	CHARAKTERISTIKA KYSELIN (ZKOUŠENÝCH VZORKŮ)	54
4.4.1	Kyselina ferulová	54
4.4.2	Kyselina <i>o</i> -kumarová	54
4.4.3	Kyselina protokatechová	54
4.4.4	Kyselina syringová	54
4.4.5	Kyselina sinapová	54
4.4.6	Kyselina kávová	54
4.5	PŘÍPRAVA SUSPENZE A ROZTOKŮ	55
4.5.1	Příprava suspenze sorbentů	55
4.5.2	Příprava pufrů	55
4.6	PŘÍPRAVA VZORKŮ KYSELIN	56
4.7	POPIS POUŽITÉHO PŘÍSTROJE	57
4.8	POPIS PRŮBĚHU MĚŘENÍ	58
5	Výsledky	64
5.1	KYSELINA FERULOVÁ NA 4 RŮZNÝCH SORBENTECH, ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK	64
5.2	CELKOVÉ SHRNUÍ VLASTNOSTÍ SORBENTŮ	76
5.3	KALIBRACE S KYSELINOU PROTOKATECHOVOU A <i>O</i> -KUMAROVOU	76
6	Diskuze	79
7	Závěr	80
8	Zdroje	81

Seznam obrázků

Obrázek č. 1: Vzorce vybraných fenolických kyselin.

Obrázek č. 2: Schéma FIA přístroje.

Obrázek č. 3: Princip FIA.

Obrázek č. 4: Dvojité píky.

Obrázek č. 5: T - bod.

Obrázek č. 6: Zastavení průtoku a vznik reakčního produktu přímo v detektoru.

Obrázek č. 7: Princip metody SIA.

Obrázek č. 8: Schéma SIA přístroje.

Obrázek č. 9: Princip BI techniky.

Obrázek č. 10: Vzhled mikročástic z různých materiálů.

Obrázek č. 11: Schéma přístroje pro BI analýzu ve formátu LOV.

Obrázek č. 12: Bioligandová metoda pro stanovení inzulínu.

Obrázek č. 13: Zachycení biotinylované DNA agarózovými částicemi pokrytými streptavidinem a následná derivatizace DNA fluorescenčním barvivem (oligreen).

Obrázek č. 14: Schéma SIC přístroje.

Obrázek č. 15: Chromatogramy totožného vzorku, SIC vs. HPLC.

Obrázek č. 16: Postkolonová derivatizace.

Obrázek č. 17: Postup u SPE.

Obrázek č. 18: Extrakční kolonka.

Obrázek č. 19: Retence nepolárního analytu na nepolárním sorbentu.

Obrázek č. 20: Retence analytů s polárními skupinami na polárním sorbentu.

- Obrázek č. 21: Iontově výměnné sorbenty.
- Obrázek č. 22: Sorbent Discovery DSC - SAX SPE.
- Obrázek č. 23: Sorbent Iontosorb TMAHP 100.
- Obrázek č. 24: Znárodnění LOV použité při měření.
- Obrázek č. 25: Záznam absorbance vzorku při dávkování do systému a eluci. Sorbent TMAHP, pH 7,0 a 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$.
- Obrázek č. 26: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent TMAHP.
- Obrázek č. 27: Záznam absorbance vzorku při dávkování do systému a eluci. Sorbent QAE - A25, pH 6,0 a 2,0, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$.
- Obrázek č. 28: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent QAE - A25.
- Obrázek č. 29: Záznam absorbance vzorku při dávkování do systému a eluci. Sorbent SAX - BOND, pH 6,0 a 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$.
- Obrázek č. 30: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent SAX - BOND.
- Obrázek č. 31: Záznam absorbance vzorku při dávkování do systému a eluci. Sorbent SAX - DSC, pH 8,5 a 1,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$.
- Obrázek č. 32: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent SAX - DSC.
- Obrázek č. 33: Eluce kyseliny protokatechové ze sorbentu SAX - BOND a QAE - A25.
- Obrázek č. 34: Eluce kyseliny *o*-kumarové ze sorbentu SAX - BOND a QAE - A25.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1: Funkční skupiny vyskytující se na nepolárních sorbentech.

Tabulka č. 2: Funkční skupiny vyskytující se na polárních sorbentech.

Tabulka č. 3: Funkční skupiny vyskytující se na iontoměničových sorbentech.

Tabulka č. 4: Klesající koncentrace pracovních roztoků kyselin.

Tabulka č. 5: Klesající koncentrace pracovních roztoků kyselin.

Tabulka č. 6: Promytí systému před začátkem měření (program č. 1).

Tabulka č. 7: Vytvoření kolonky (program č. 2).

Tabulka č. 8: Propláchnutí hadičky mezi zkumavkou se vzorkem a ventilem
(program č. 3).

Tabulka č. 9: Měření (program č. 4).

Tabulka č. 10: Promytí kolonky promývacím pufrem (program č. 5).

Tabulka č. 11: Odstranění kolonky (program č. 6).

Tabulka č. 12: Konečné promytí systému vodou (program č. 7).

Tabulka č. 13: Odstranění vzduchové bubliny (program č. 8).

Tabulka č. 14: TMAHP – nástřik.

Tabulka č. 15: TMAHP – eluce.

Tabulka č. 16: QAE - A25 – nástřik.

Tabulka č. 17: QAE - A25 – eluce.

Tabulka č. 18: SAX - BOND – nástřik.

Tabulka č. 19: SAX - BOND – eluce.

Tabulka č. 20: SAX - DSC – nástřik.

Tabulka č. 21: SAX - DSC – eluce.

Tabulka č. 22: Směrnice přímek eluce kyseliny ferulové, protokatechové a *o*-kumarové na sorbentech SAX - BOND a QAE - A25.

Seznam zkratk

BHP (Benigní Hyperplasie Prostaty)

BI (Bead Injection, mikročasticová analýza)

cFI (constant Flow Injection, konstantní průtoková rychlost)

FIA (Flow Injection Analysis, průtoková injekční analýza)

HPLC (High Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie)

LEDs (Light Emitting Diodes, diody emitující záření)

LOV (Lab On Valve, laboratoř na ventilu)

pFI (programmed Flow Injection, programovaná průtoková rychlost)

RSD (Relative Standard Deviation, relativní směrodatná odchylka)

SAX (Strong Anion Exchanger, silný měnič aniontů)

SCX (Strong Cation Exchanger, silný měnič kationtů)

SIA (Sequential Injection Analysis, sekvenční injekční analýza)

SIC (Sequential Injection Chromatography, sekvenční injekční chromatografie)

SPE (Solid Phase Extraction, extrakce na tuhou fázi)

WAX (Weak Anion Exchanger, slabý měnič aniontů)

WCX (Weak Cation Exchanger, slabý měnič kationtů)

1 Úvod

Fenolické látky, mezi které patří i kyselina ferulová, jsou významné antioxidanty, které mohou mít nezanedbatelný význam při léčbě či předcházení různých onemocnění. Tyto molekuly se hojně vyskytují v rostlinách, které jsou používány v lidovém léčitelství.

Aby mohly tyto sloučeniny postoupit od lidového léčitelství k medicíně založené na důkazech, je zapotřebí je z rostlin nejprve vyizolovat, poté přečistit a nakonec identifikovat a přesně stanovit. Všechny tyto kroky jsou již velmi dobře zvládnuté a v současnosti převažuje snaha o maximální zjednodušení těchto postupů, redukcí objemu použitých činidel, s čímž souvisí i nižší cena a ochrana životního prostředí, a v neposlední řadě jejich automatizace, se kterou se pojí i vyšší efektivita a rychlost.

Nejčastější metodou pro úpravu vzorku před samotnou analýzou je SPE (extrakce na tuhou fázi). Tuto elegantní metodu je možné ještě miniaturizovat a zautomatizovat, což je výsledkem mnohaletého vývoje průtokových technik.

Od prvních počátků průtokových metod uplynulo už více než 40 let, v průběhu kterých se tyto metody posunuly od průtokové injekční analýzy přes sekvenční injekční analýzu, sekvenční injekční chromatografii až k laboratoři na ventilu, která kombinuje výhody sekvenční injekční chromatografie a miniaturizace v jednom systému.

BI - LOV, neboli mikročasticová analýza v laboratoři na ventilu, patří k nejnovějším metodám průtokové analýzy. Mezi její výhody patří velká variabilita, která nachází uplatnění zejména v oblasti výzkumu – v testování možných i nemožných uspořádání průtokového analyzátoru, typů sorbentů, promývacích a elučních pufrů, vzorků, metod detekce, způsobů vyhodnocování a programování jednotlivých operací.

Tato diplomová práce se zabývá BI - LOV analýzou, prostřednictvím které se snaží dát základy pro úpravu rostlinného vzorku tak, aby bylo v budoucnu možné od sebe oddělit jednotlivé fenolické kyseliny v automatizovaném systému, který provede vše od jejich zachycení na tuhou fázi, přes vymytí balastů až nakonec k jejich postupné eluci, identifikaci a stanovení obsahu kontinuálně a sám.

2 Cíl

Cílem této práce bylo vyzkoušet a popsat chování kyseliny ferulové a dalších fenolických kyselin o různých koncentracích na čtyřech rozdílných iontově výměnných sorbentech pro extrakci na tuhou fázi za měnících se podmínek – pH promývacího pufru v rozmezí hodnot 5,0 – 8,5 a pH elučního pufru 1,5 – 2,5.

Dále pak určit, za jakých podmínek a se kterým sorbentem bude nejvhodnější provést následné měření na jiném analyzátoru, s externí kolonkou a se směsným vzorkem více fenolických kyselin.

3 Teoretická část

3.1 FENOLICKÉ KYSELINY

Fenolické látky patří do široké skupiny antioxidantů, tedy látek, jejichž molekuly omezují aktivitu kyslíkových radikálů. Záměrně se proto přidávají do potravin, kde svým antioxidačním působením prodlužují jejich stálost. Přirozeně se nacházejí v půdě a v rostlinách, především v kořenech, listech a plodech [1, 2].

Antioxidační vlastnosti těchto sloučenin mohou pozitivně ovlivňovat terapii a prevenci nemocí spojených s oxidačním stresem, jako jsou např. malignity, ateroskleróza a kardiovaskulární choroby, neurodegenerativní choroby (Alzheimerova a Parkinsonova nemoc), revmatoidní artritida, virová onemocnění aj. Počínající benigní hyperplasie prostaty (BHP) a prostatitida jsou příklady častých potíží, které jsou v lidové medicíně tradičně léčeny pomocí léčivých rostlin (různé druhy rodu *Epilobium*, např. *Epilobium parviflorum*, *Epilobium arisatum* a zástupci čeledi *Onagraceae*) [1, 3].

Etiopatologie BHP je nejasná, ke vzniku BHP vede přílišná proliferace buněk, která může být indukována nerovnováhou mezi androgeny, estrogeny a růstovými faktory, nebo oxidačním stresem. Fenolické sloučeniny byly označeny jako potenciální inhibitory enzymu 5 α - reduktázy, který je s těmito problémy spojený, a proto by mohly být užitečné v prevenci BHP, nebo jako nedílná součást léčby androgen - dependentních chorob. BHP je nejčastější neoplazie, která se vyskytuje v mužské populaci. U mužů ve věku 60 let je prevalence BHP přes 50 % s tendencí se s věkem zvyšovat. Hrubé odhady naznačují, že přes 90 % mužské populace ve věku 90 let trpí některou formou BHP [3].

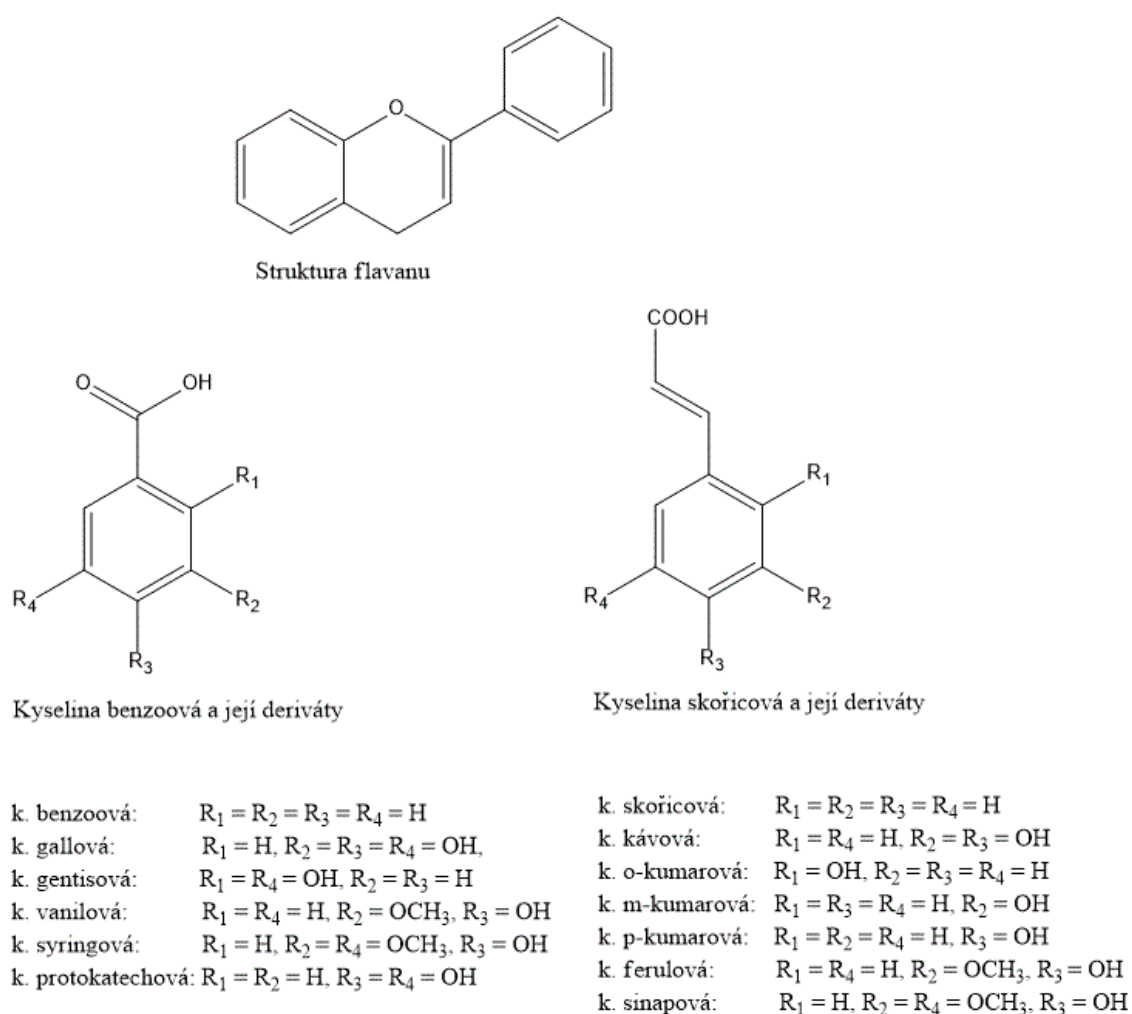
Podle struktury rozdělujeme fenolické látky do několika skupin (obrázek č. 1). První skupinu tvoří flavanoly odvozené od heterocyklického flavanu. Další skupinu tvoří aromatické hydroxykyseliny, kam patří deriváty kyseliny skořicové, kyseliny benzoové a jejich estery [1, 3].

Deriváty kyseliny benzoové: kyselina gallová, její dimer kyselina hexahydroxydifenová, kys. gentisová, vanilová, syringová, protokatechová aj. Kyselina

gallová je základem hydrolyzovatelných tříslovin čeledí *Rosaceae* (př. *Filipendula ulmaria*), *Asteraceae* (př. *Solidago virgaurea*) a *Salicaceae* (př. *Salix alba*).

Deriváty kyseliny skořicové: kys. *o*-kumarová, *m*-kumarová, *p*-kumarová, kávová, sinapová, ferulová, chlorogenová aj. jsou nejvíce obsaženy v zástupcích čeledí *Asteraceae*, *Lamiaceae* a *Boraginaceae*.

Estery kyseliny benzoové a skořicové se vyskytují především v řádech *Lamiales*, *Oleales*, *Asterales* a čeledi *Fabaceae* (př. *Myroxylon balsamum* var. *pereirae*) [4].



Obrázek č. 1: Vzorce vybraných fenolických kyselin odvozených od kyseliny benzoové a kyseliny skořicové. Převzato a upraveno dle [1, 3, 4].

3.2 PRŮTOKOVÁ INJEKČNÍ ANALÝZA A PŘÍBUZNÉ TECHNIKY

Růžička a Hansen navrhli roku 1975 první koncept FIA (Flow Injection Analysis), jenž spustil vlnu zkoumání, která trvá již přes čtyřicet let, zaměstnává tisíce vědců a doposud vedla ke vzniku více než 20 000 publikací v mezinárodní vědecké literatuře [5].

Na téma FIA bylo od jejího vzniku publikováno množství specializovaných monografií a došlo k řadě významných pokroků jak v oblasti FIA, tak i SIA (Sequential Injection Analysis) a později k představení průtokových systémů LOV (Lab On Valve) a BI (Bead Injection) [5].

FIA a jí příbuzné metody nacházejí uplatnění zejména v monitorování průmyslových procesů (např. při výrobě potravin, nápojů, léčiv, kosmetiky) a při monitorování životního prostředí (vody, půdy apod.) [5].

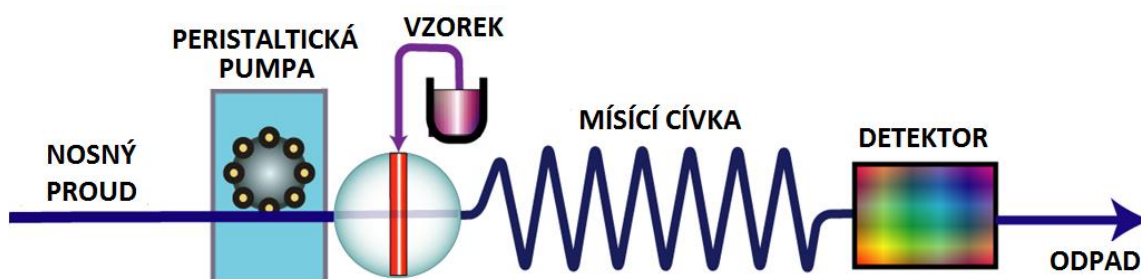
Hlavní výhodou FIA je možnost zautomatizovat širokou škálu klasických chemických reakcí využívaných k analýze za použití jednoduchého zařízení, které poskytuje plnou kontrolu nad jednotlivými operacemi. FIA odstranila obtěžující opakující se manuální úkony, které jsou prováděny při klasické laboratorní práci, jež je oproti FIA ještě navíc méně přesná, trvá déle, spotřebuje více reagensů i vzorku a v neposlední řadě neumožňuje zachytit kinetiku probíhající reakce, což je v některých případech důležitější než samotný výsledek reakce [5, 6].

3.2.1 Schéma přístroje

Zjednodušené schéma FIA systému můžeme vidět na obrázku č. 2. Nejjednodušší jednoliniová FIA používá peristaltickou pumpu, která pohání nosnou kapalinu do reakční smyčky a dále do detektoru.

Průtoková rychlost je řízena pumpou, která může **vytvářet různé** průtokové rychlosti v průběhu jednoho cyklu chemické analýzy (výhodou je vyšší citlivost a nižší detekční limit), nebo pracovat rychlostí **konstantní**.

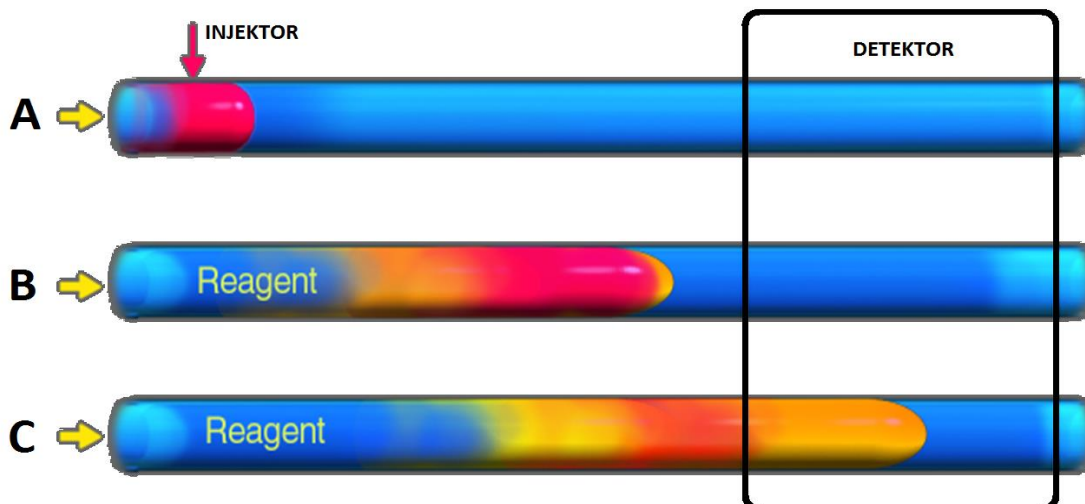
Typický systém FIA pracuje průtokovou rychlostí v rozmezí 1 – 2 ml/min, objem vstříknutého vzorku je 50 – 300 μ l, průměr hadičky obvykle 0,8 mm, její délka do 2 m a rychlost analýzy obvykle 1 – 2 vzorky za minutu [7].



Obrázek č. 2: Schéma FIA přístroje. Peristaltická pumpa dává do pohybu nosný proud, do kterého je přes injekční ventil nadávkován vzorek. Ten putuje do mísící cívky a reaguje s reakčním činidlem obsaženým v nosném proudu. Produkt reakce (ať již zcela proběhlé nebo teprve probíhající) je zaznamenán detektorem a putuje dále do odpadu. Převzato a upraveno dle [7].

3.2.2 Princip

Obrázek č. 3 nám zjednodušeně ukazuje princip FIA. Prvním krokem je odměření přesného objemu vzorku a jeho vstříknutí do proudu reagenčního činidla. Jak se zóna vzorku (červeně) pohybuje, dochází k jeho promíchávání s reagenčním činidlem pomocí disperze a vzniká reakční produkt (žlutě). Míra promísení a délka reakční doby je řízena průtokovou rychlostí, objemem kanálu a geometrií kanálu. Proto je časový interval mezi nastříknutím vzorku a detekcí analytu reprodukovatelný. Všechny vzorky podstupují tentýž proces, což umožňuje porovnání záznamů standardů s neznámými vzorky. Detektor umístěný na konci průtokových hadiček zaznamenává u kapaliny procházející průtokovou celou změnu barvy nebo jiného parametru, která umožní detekovat produkt reakce [7].



Obrázek č. 3: Princip FIA. V části obrázku **A** dochází k nastříknutí vzorku (červeně) do proudu reakčního činidla (modře). V části **B** je znázorněno postupné smíšení vzorku s reagenčním činidlem a vznikající produkt reakce (oranžově). Část **C** znázorňuje vstup produktu reakce (oranžově) do detektoru. Převzato a upraveno dle [7].

3.2.3 Mísení pomocí disperze

Klasické chemické analýzy jsou prováděny jednotlivě v kádinkách nebo zkumavkách, což umožňuje homogenní a rychlé promísení vzorku s reagenčním činidlem. Naproti tomu jsou průtokové techniky založeny na řízené disperzi zóny vzorku, která vytváří koncentrační gradient, zatímco vzorek putuje systémem směrem k detektoru [6, 7].

Odezva detektoru průtokového injekčního systému je proto výsledkem dvou kinetických dějů: **fyzikálního procesu disperze zóny vzorku** a **chemického procesu tvorby produktu reakce**. Navíc musí být FIA systém zhotoven tak, aby byla radiální disperze co největší, zatímco axiální disperze mohla být řízena podle potřeby dané reakce.

Zatímco reakce s jedním reagenčním činidlem mohou být provedeny na nejjednodušším jednokanálovém přístroji, většina FIA technik používá vícekanálové přístroje, ve kterých je několik reagenčních činidel spojeno s nosným proudem. Reakční

směs putuje průtokovým kanálem buď konstantní průtokovou rychlostí (cFI = constant Flow Injection) nebo programovanou průtokovou rychlostí (pFI = programmed Flow Injection) [7, 8].

3.2.4 Základní procesy, na kterých jsou založeny průtokové injekční techniky

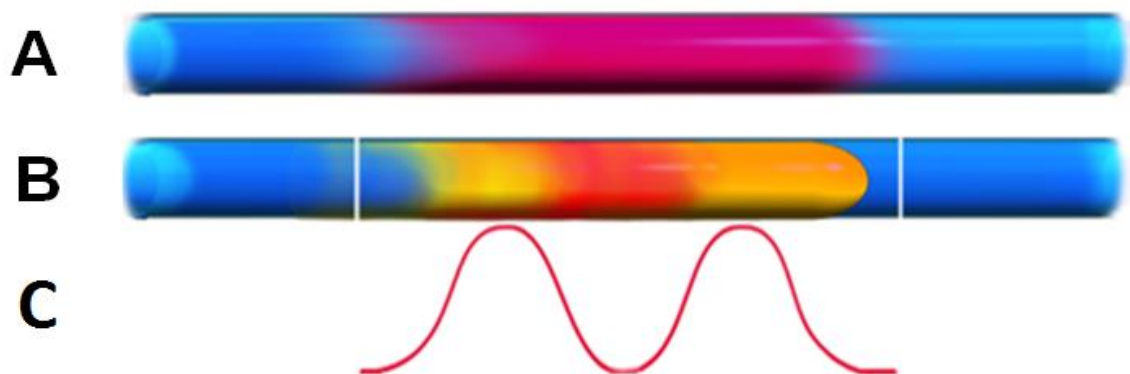
Dávkování vzorku: za počáteční čas analýzy se považuje okamžik nadávkování vzorku do systému.

Řízená disperze zóny vzorku: k řízené disperzi (rozmývání) zóny vzorku dochází při jeho průchodu systémem. Tento proces tvoří dobře definovaný koncentrační gradient, který si můžeme představit jako zónu vzorku segmentovanou na části s různou koncentrací, kde nejvyšší koncentrace (c_{\max}) odpovídá maximální výšce píku. Protože je snadné lokalizovat maximum výšky píku, většina FI metod používá tuto veličinu jako hlavní výstup. K optimalizování dané analýzy je užitečné vědět, do jaké míry byl vzorek zředěn ve FI systému a po jakou dobu byl dostupný pro proběhnutí chemické reakce.

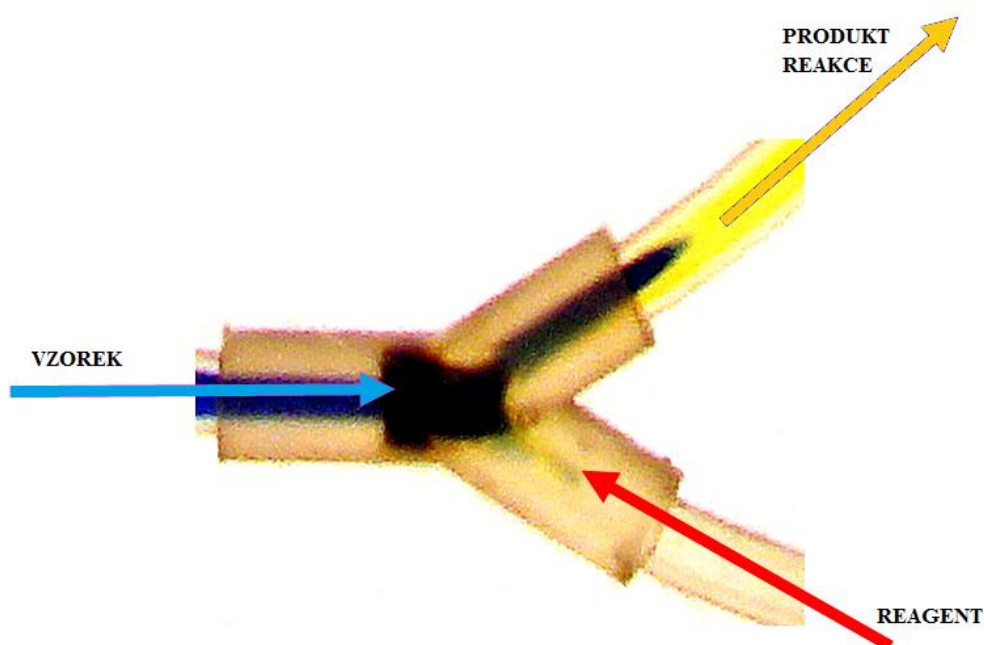
Reprodukovatelné časování procesu: jedná se o dobu, která uplyne od nastříknutí vzorku do systému po dosažení maximální výšky píku. Tato doba je u stejného vzorku vždy stejná [7, 9].

3.2.5 Dvojitě píky

Vstříknutí příliš velkého objemu vzorku do systému způsobí vznik dvojitých píků, jak nám ukazuje obrázek č. 4. K tomuto jevu dochází proto, že do středu zóny vzorku se nedostane reagenční činidlo. Tento jev lze odstranit zmenšením objemu vstřikovaného vzorku, nebo použitím dvoukanalového přístroje vybaveného **T - bodem**, který můžeme vidět na obrázku č. 5. Pomocí T - bodu je do systému kontinuálně přidáváno reagenční činidlo, přičemž lokální turbulence zajišťuje jeho důkladné promíchání v radiálním směru [6, 7].



Obrázek č. 4: Dvojité píky. V části obrázku **A** je růžově znázorněna široká zóna vzorku před reakcí, v části **B** je zobrazena tato zóna po reakci s reagenčním činidlem (žlutě je znázorněn produkt reakce, červeně nezreagovaná střední oblast zóny vzorku, ke které se reakční činidlo nedostalo), v části **C** je zobrazen dvojitý pík (střední propad odpovídá nezreagovanému vzorku). Převzato a upraveno dle [7].



Obrázek č. 5: T - bod. Zóna bazické formy pH indikátoru (modrá) je spojena s proudem kyseliny a vzniká neutrální produkt reakce (žlutá). V T - bodě se v radiálním směru vytváří lokální turbulence, která má za následek okamžité smísení proudící zóny vzorku s reagenčním činidlem. Převzato a upraveno dle [7].

Zvolení správného objemu vzorku, který má být vstříknut do systému je užitečným nástrojem pro optimalizaci všech FIA technik. Umožňuje úpravu senzitivity a detekčního limitu, verifikaci lineárního rozsahu detektoru při různých vlnových délkách a automatické ředění vzorku.

Protože SI techniky jsou založeny na jednobanálním zařízení, objemy vstříknutých vzorků a reagenčních činidel musí být důkladně zvoleny a průtok programován tak, aby zpětným tokem a zrychlením bylo zajištěno důkladné promísení reagensů [7].

3.2.6 Maximalizace citlivosti procesu

- snížením průtokové rychlosti – pro pomalejší reakce
- zvýšením objemu vzorku vstříknutého do systému (ale ne příliš)
- přidáním reagenčních činidel do systému přes T - body
- zvýšením koncentrace reagenčních činidel
- zvýšením teploty systému
- použitím delší průtokové cely
- použitím BI (Bead Injection) – zakoncentrování analytu

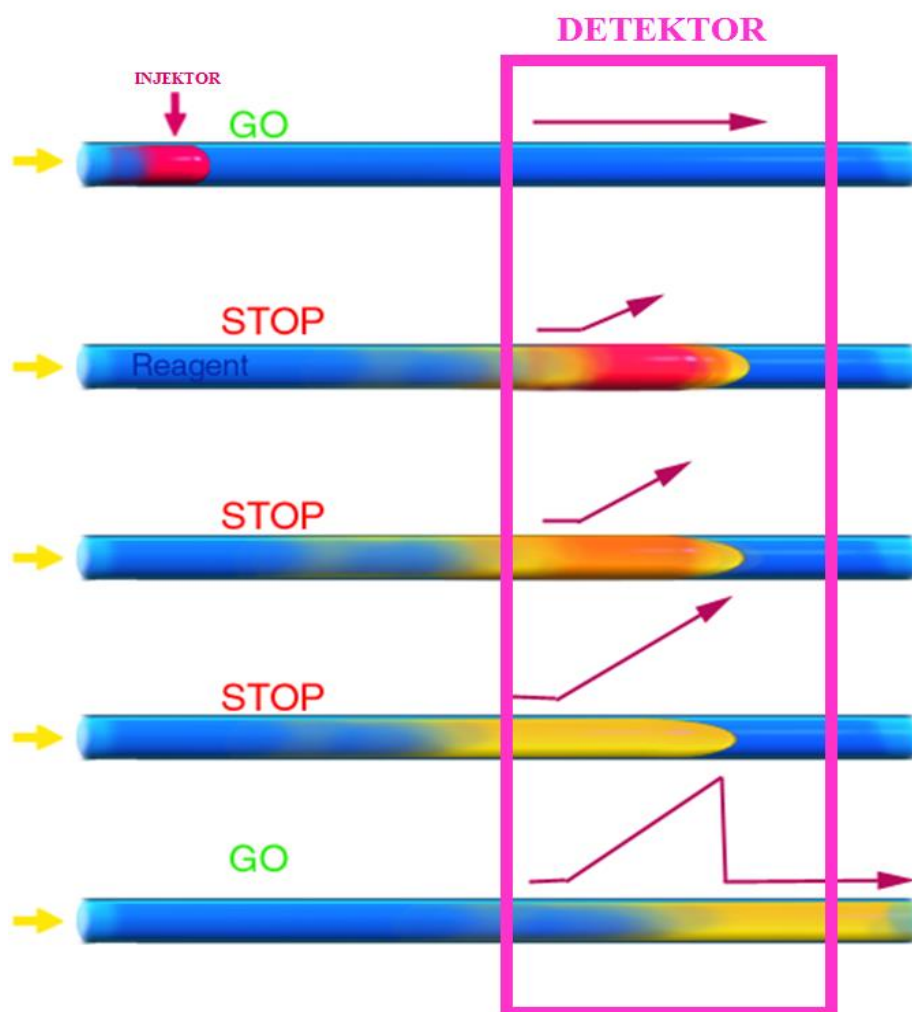
3.2.7 Průtoková rychlost programovatelná vs. konstantní

Se zvětšující se délkou průtokového kanálu klesá maximální výška píku a jeho tvar se mění z asymetrického na symetrický, základna se rozšiřuje a čas, ve kterém pík dosahuje maxima, vzrůstá. Toto je základní omezení systému, založeného na konstantní průtokové rychlosti, protože jediný způsob, jak prodloužit inkubační dobu, spočívá v prodloužení průtokového kanálu [7, 8].

Použití programovatelného průtoku (pFI), namísto konstantního (cFI), umožňuje prodloužit inkubační čas zpomalením nebo zastavením proudu a naopak zrychlit proud při promývání systému. Programování průtokové rychlosti dělá jak FIA tak SIA efektivnější, protože umožňuje minimalizovat objem použitých reagensů i vzorku.

Zastavení průtoku poskytuje delší reakční čas bez nebezpečí rozmývání vzorku a poskytuje vyšší citlivost. Vyžaduje méně reagentů a produkuje méně odpadu než kontinuální průtok. Umožňuje miniaturizaci díky zmenšení délky mezi injektorem a detektorem. Principem je zastavení vybrané části zóny vzorku v detektoru. Pokud reakce nedosáhla rovnováhy cestou do detektoru, bude vznik reakčního produktu zaznamenán křivkou reakční rychlosti, jak můžeme vidět na obrázku č. 6 [6, 7].

U peristaltických pump je nižší reprodukovatelnost než u pump pístových [7].



Obrázek č. 6: Zastavení průtoku a vznik reakčního produktu (žlutě) přímo v detektoru. Převzato a upraveno dle [7].

3.2.8 Aplikace

FIA nachází využití v zemědělství a analýze rostlinného materiálu, kontrole kvality vody a životního prostředí, v chemickém průmyslu, oceánografii atd.

Využívá se mimo jiné FI titrace, On Line rozklad vzorku (UV nebo mikrovlny u analýzy organických i anorganických látek) a separace složek vzorku při průtoku systémem (extrakce na tuhou fázi, membránová separace, extrakce z kapaliny do kapaliny, extrakce mezi plynem a kapalinou) [7, 10].

3.2.9 Přístroj

Komerčně dostupné FI přístroje se značně liší ve svém designu a aplikacích. Design spadá do dvou kategorií: „černá skříňka“ nebo „otevřená architektura“.

U černé skříňky má uživatel omezený přístup k funkcím systému, včetně programování softwaru, je ideální pro rutinní analýzy, údržba a řešení problémů musí být prováděny autorizovaným servisem.

U přístroje s otevřenou architekturou může uživatel modifikovat přístroj podle svých potřeb, kontrolovat zrakem kapaliny proudící v hadičkách, přidávat komponenty navíc a celý systém tak upgradovat a v neposlední řadě celý proces programovat podle potřeby.

K dalšímu rozvoji FIA patří náhrada klasické peristaltické pumpy pumpou pístovou, mezi jejíž výhody patří rezistence ke korozivním chemikáliím, přesné řízení průtoku, možnost programovatelného průtoku a odpadá problém s mechanickým opotřebením hadiček [7].

3.2.10 Komponenty

Ventil: dvoucestný nebo vícecestný.

Pumpa: peristaltická nebo pístová.

Hadičky: nejčastěji se používají hadičky s vnitřním průměrem 0,5 – 0,8 mm, jsou barevně odlišené pro snadný výběr správného průměru pouhým pohledem. Mohou být z teflonu i jiných chemicky a mechanicky odolných polymerů, nebo z nerezavějící oceli, jejíž výhodou je tepelná vodivost, nepropustnost pro plyny a minimální adsorpce chemikálií na vnitřní stěnu.

Průtoková cela: *optická vlákna mají významný vliv na celý design FI analyzátoru. Průtokovou celu je možné vyjmout ze spektrofotometru a umístit ji dovnitř průtokového kanálu, což je základem pro LOV (Lab On Valve) design.*

Zdroje světla: LEDs (Light Emitting Diodes) jsou miniaturizované elektroluminiscenční světelné zdroje, které pokrývají rozsah od 270 do 810 nm. Jejich výhodou je malá velikost, nízká spotřeba energie, robustnost a dlouhá životnost. Wolfram - halogenové (360 – 2500 nm) a deuterio – wolfram - halogenové zdroje světla (215 – 2000 nm) jsou oproti LEDs dražší s kratší životností.

Detektor: přes 60 % průtokových analýz využívá pro detekci UV - VIS spektrofotometrii, zbylá část připadá na fluorescenci, atomovou absorpci, voltometrii a optické a elektrochemické senzory.

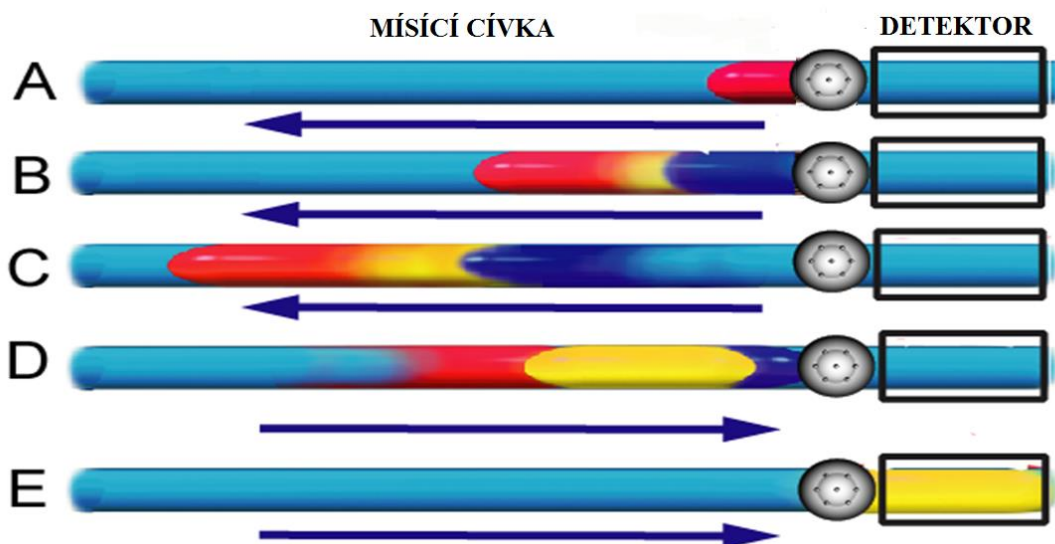
Software: existuje několik programů, které jsou dodávány s FIA a SIA systémem (např. FIALab, GlobalFIA), nebo jsou dostupné samostatně. Vývoj softwaru je nikdy nekončící proces, jelikož požadavky a potřeby analýzy jdou neustále kupředu. Ideální software by se měl vyznačovat automatickou optimalizací metody, možností integrace širokého spektra periferních zařízení bez potřeby znalosti programování, měl by být schopen komunikovat s dalšími softwary, databázemi a statistickými programy [7, 10].

3.3 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ ANALÝZA

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) patří do skupiny průtokových analytických technik, které umožňují racionalizovat a automatizovat složité postupy při analýze velkých sérií vzorků instrumentálními metodami, a tak podstatným způsobem zvyšovat produktivitu zejména rutinních stanovení. SIA byla vyvinuta během odstraňování nevýhod a nedokonalostí techniky průtokové injekční analýzy (FIA) [11].

3.3.1 Princip a vlastnosti metody SIA; srovnání s technikou FIA

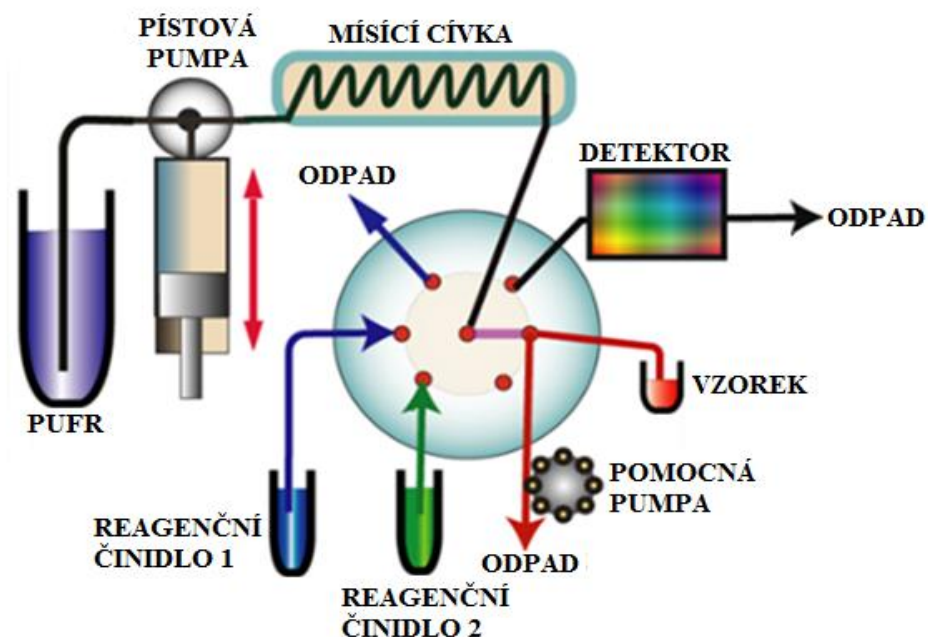
U konvenční FIA je zóna vzorku injikována dávkovacím ventilem do kontinuálního nosného proudu a mísí se s činidlem za vzniku produktu reakce při plynulém průtoku jednotlivých zón vícekanálovým systémem směrem k detektoru. Technika SIA používá odlišný princip, jehož charakteristickým rysem jsou oddělené měřicí cykly. Nejprve jsou zóny nosného média, vzorku a činidla postupně (jedna po druhé) aspirovány do jednokanálového systému s využitím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla a poté je pohyb pístu čerpadla (tok) obrácen, čímž dojde k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je dopraven do detektoru (obrázek č. 7); tím je jeden měřicí cyklus ukončen. V tomto jednoduchém případě je získán výsledný analytický signál ve formě píku podobně jako je tomu u FIA; v podstatě se jedná o záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu jeho zóny detektorem. Rozdíly se projevují v geometrii nosného proudu. FIA využívá přímý konstantní tok, zatímco základem SIA jsou změny přímého a zpětného toku [11].



Obrázek č. 7: Princip metody SIA. Část obrázku **A** - aspirace vzorku (červeně) do systému pomocí zpětného toku. Část **B** - aspirace reagenčního činidla (tmavě modře) a tvorba produktu reakce (žlutě) na rozmezí vzorek/činidlo. Část obrázku **C** - mísení vzorku a reagentu ve větší míře a narůstající zóna vzniklého produktu (žlutě). Části obrázku **D** a **E** - obrat směru proudění (pístová pumpa nenasává, ale vytlačuje), vzniklý reakční produkt putuje do detektoru. Veškerý pohyb kapalin zajišťuje jedna pístová pumpa, synchronizaci pohybu kapalin zajišťuje vícecestný ventil. Převzato a upraveno dle [7].

3.3.2 Schéma přístroje

Typická základní konfigurace příslušného SIA systému je schematicky znázorněna na obrázku č. 8. Systém je tvořen jednonálovým dvousměrným pístovým čerpadlem, vícecestným selekčním ventilem, vhodným detektorem, mísící cívkou, která slouží zároveň jako pojistka proti vniknutí vzorku a činidel do čerpadla, a spojovacím materiálem (obvykle plastové hadičky s vnitřním průměrem 0,7 - 0,8 mm). V podstatě se dá říci, že SIA systém pracuje v cyklu naprogramovaných pohybů pístu čerpadla, synchronizovaných s přepínáním pozic selekčního ventilu. Přesná synchronizace a opakovatelnost těchto kroků je nutnou podmínkou k dosažení reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému a tím i k získání reprodukovatelného koncentračního gradientu reakčního produktu, resp. odpovědi detektoru. Z uvedených skutečností vyplývá, že nezbytnou součástí SIA systému musí být i počítač s příslušným programovým vybavením, který řídí kroky měřicího cyklu a současně sbírá, uchovává a vyhodnocuje výstupní data [11].



Obrázek č. 8: Schéma SIA přístroje. Pístová pumpa aspiruje vzorek a reagenční činidlo do mísící cívky, kde dochází ve větší míře k jejich promísení a vzniku reakčního produktu. Při obráceném pohybu pístu pumpy, tedy dopředu, putuje produkt reakce do detektoru a následně do odpadu. Vše je synchronizováno pomocí vícecestného ventilu. Převzato a upraveno dle [7].

Průtokové rychlosti a doba trvání jednoho měřicího cyklu v SIA se prakticky neliší od FIA. Zatímco ve FIA je v rámci jedné série měření dávkovaný objem vzorku fixní, což je dáno konstantní délkou dávkovací smyčky, u SIA je možno v jednotlivých cyklech objem vzorku cíleně měnit v rozsahu jednotek až stovek μl programováním objemu nasátého pumpou; tímto postupem lze jednak optimalizovat disperzi zóny vzorku (a tedy citlivost stanovení) podle koncentrace analytu a také pohodlně provádět kalibraci, pokud jeden z kanálů selektivního ventilu propojíme s roztokem standardu [11].

SIA má proti FIA nesporné výhody: i když se pracuje s několika roztoky, které je nutno definovaným způsobem vnést do systému, probíhá analýza v jednobanálním uspořádání s jedním ventilem a jedním čerpadlem. Objemy roztoků jsou dány délkou pohybu pístu čerpadla. Při zastaveném toku je možné provádět kinetická měření, např. určovat řád reakcí, stejně jako ve FIA. Tyto postupy vedou k optimalizaci reakčního času, úspoře činidel a eliminaci interferujících signálů pozadí. Protože SIA pracuje s malými objemy vzorků a činidel a využívá zastavení a změnu směru toku, spotřeba činidel a vzorků i objem odpadu jsou podstatně nižší než u FIA, kde jsou jednotlivé

roztoky čerpány kontinuálně. Velkou výhodou SIA je její flexibilita, daná snadnou změnou parametrů měření prostřednictvím klávesnice počítače, aniž je třeba měnit konfiguraci SIA systému [11].

Vstupní jednotkou SIA systému je čerpadlo, které generuje definovaný tok nosného proudu. Pohyb pístu čerpadla je řízen krokovým elektromotorem. Délku a rychlost pohybu pístu lze libovolně měnit. Další alternativou je použití peristaltických čerpadel, ty představují řešení s nižší pořizovací cenou a širokou dostupností, ale vzhledem k jejich snadnějšímu mechanickému opotřebením jsou však v SIA systémech peristaltická čerpadla používána spíše jako pomocná zařízení vedle hlavní pístové pumpy [11].

Další součástí systému je vícecestný selekční ventil. Nejčastěji se jedná o 6, 8 a 10 - cestné ventily firmy Valco. Selekční ventil představuje jednotku, která řídí seřazení jednotlivých zón v mísící cívce, zajišťuje připojení všech požadovaných roztoků k systému, jejich aspiraci, a po obrácení toku i transport zón do detektoru. Časování poloh selektoru a jejich synchronizaci s pohybem čerpadla řídí a kontroluje počítač [11].

Reakční (mísící) cívky v SIA systémech jsou jednodušší a kratší než u FIA zařízení. Buď slouží pouze k promíchání zón, nebo mohou obsahovat reaktivní náplň, např. pevné nosiče s imobilizovanými enzymy nebo magnetické polymerní částice s aktivním povrchem. Způsob umístění mísící cívky v SIA systému není zcela ustálen. Často bývá jediná reakční cívka zařazena mezi čerpadlo a selekční ventil. Druhá cívka může být eventuálně umístěna před detektorem, ale u rychle probíhajících reakcí se nepoužívá [11].

Detektory v SIA nejsou systémově omezeny, jejich volba záleží na druhu použité analytické reakce. Využívají se zejména spektrofotometrické, fluorescenční a elektrochemické detektory s příslušnými průtokovými celami. U spektrofotometrických detektorů se nejčastěji vyskytuje Z - cela s optickou délkou 10 mm a vnitřním průměrem 1,5 mm. Dále lze využít tzv. jet - ring celu, fontánovou celu, univerzální sendvičovou membránovou celu, nebo celu mikroobjemovou. V rámci elektrochemické detekce se vedle běžných amperometrických průtokových cel často uplatňují iontově selektivní a enzymové elektrody [11].

Mechanické součásti SIA systému (čerpadlo, selekční ventil) a detektor jsou propojeny prostřednictvím příslušných převodníků a digitálních vstupů a výstupů těchto jednotek s počítačem, který řídí celý proces automatické analýzy včetně sběru, zpracování a ukládání dat. Klíčový význam zde má kvalitní obslužný program SIA systému, bez něhož nelze automatická SIA měření provádět; příslušný software musí též „umět“ zpracovat a v hodným způsobem prezentovat výsledky měření. Běžný je automatický výpočet výšky, plochy a dalších parametrů píku (čas dosažení jeho maxima, šířka píku v určité výšce), kalibračních parametrů a koncentrace vzorku. Tyto programy, jako např. Flowtek, Fialab, Labpro, Lab - data a Mat - lab většinou poskytují také funkci automatické kalibrace a tvorbu grafů pro přehledné znázornění výsledků analýzy [11].

Stejně jako je tomu u zařízení FIA, i do SIA systému je možno zařadit různé doplňkové moduly. Jsou to zejména jednotky pro kapalinovou extrakci, dialýzu a difúzi plynů přes membránu [11].

3.3.3 Uplatnění SIA v praxi

Rychlost, jednoduchost, flexibilita a plná automatizace předurčují techniku SIA jako velmi vhodný prostředek všude tam, kde je nutno analyzovat velké série vzorků (např. rutinní analýzy vod, potravin, krve, moči), sledovat změny koncentrace důležitých analytů v průběhu různých procesů (řízení a optimalizace biotechnologických výrob, monitorování hladin léčiv nebo jejich metabolitů v tělních tekutinách pacientů) nebo studovat odpověď buněk, membrán či orgánů na různé vnější podněty (např. ve farmaceutickém výzkumu).

Možnost uplatnění SIA ve farmacii se vztahuje nejen na kontrolu kvality a účinnosti léčiv, ale také na hodnocení déle trvajících stabilitních studií. Ve výrobní technologii pomáhá tato metoda zjistit stejnoměrnost obsahu účinné látky v různých farmaceutických přípravcích a rychlost jejího uvolňování z dané lékové formy (disoluční testy). Významná je také možnost využití SIA při studiu vazby léčiv či toxických látek na krevní bílkoviny [11].

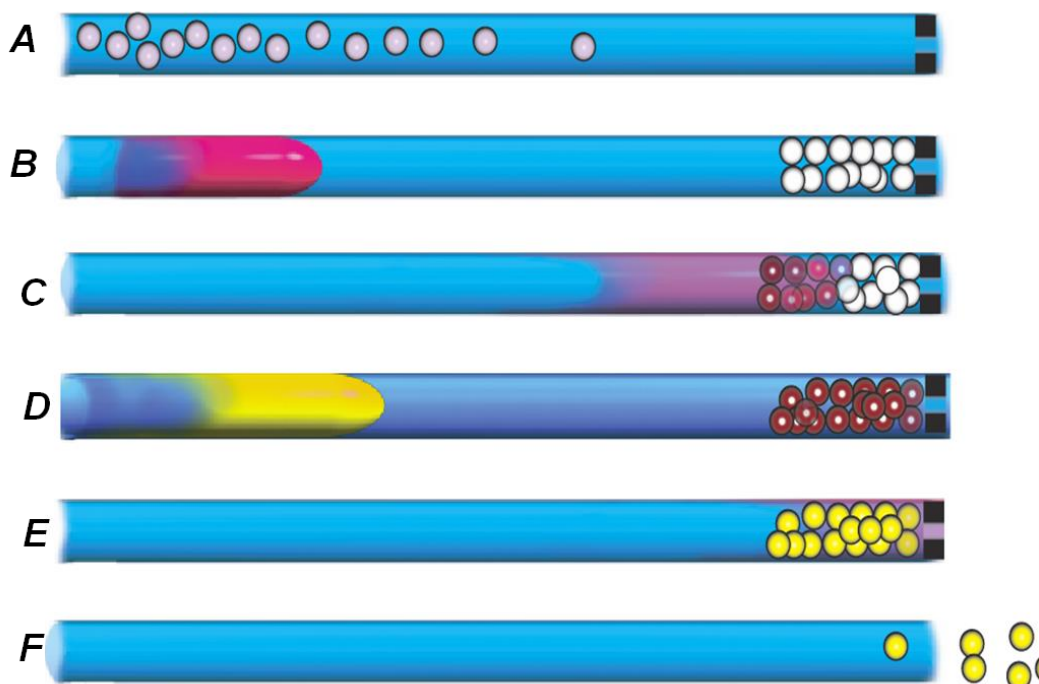
3.4 TECHNIKY ZALOŽENÉ NA MIKROČÁSTICÍCH

Techniky založené na mikročasticích (Bead Injection, BI) jsou třetí generací FIA technik. Při jejich nejjednodušším provedení je přesně definovaný objem suspenze mikročastic vstříknut do průtokového systému, kde jsou částice zachyceny na určeném místě. Následně je do systému vstříknut vzorek, jehož zóna projde skrz vrstvu pevných částic (mikrokolonu). Molekuly vzorku reagují s funkčními skupinami (bioligand, iontově výměnná nebo C - 18), které jsou uchyceny na povrchu mikročastic [7, 12].

Zadržené molekuly analytu jsou spektroskopicky detekovány buď ve své původní formě, nebo po reakci s chromogenním či fluorescenčním činidlem. Nebo mohou být z částic eluovány a detekovány níže po proudu. Na konci analýzy jsou částice transportovány zpětným tokem na jiné místo v systému, nebo vypuštěny do odpadu [7].

Stručné schéma BI techniky je zachyceno na obrázku č. 9.

Hlavní výhodou BI je adsorpce cílového analytu na povrchu částic, zatímco ostatní (nezadržené) části vzorku jsou odplaveny do odpadu. Tento způsob zakoncentrování analytu zvyšuje citlivost analýzy i snižuje detekční limit [7].



Obrázek č. 9: Princip BI techniky. Část obrázku **A** – do systému je vstříknuta suspenze mikročástic, která je následně zachycena na předem určeném místě – vytvoří mikrokolonu; **B** – do systému je vstříknut vzorek, jehož zóna se pohybuje směrem k sorbentu; **C** – vzorek prochází skrz částice, na jejichž povrchu dochází k zachycení analytu, ostatní nezachycená matrice odchází do odpadu spolu s nosným proudem; **D** - vpravení chromogenního substrátu do systému; **E** - analyt, zachycený na pevných mikročásticích, reaguje s chromogenním substrátem za vzniku barevného nebo jinak detekovatelného produktu; **F** – konečné vymytí částic ze systému, nebo jejich regenerace. Převzato a upraveno dle [7].

3.4.1 Materiál

U částic, používaných při BI technikách, musí být známa jejich velikost, tvar a materiál, ze kterého jsou vyrobeny. Částice musí být sférické a o velikosti v rozmezí 20 – 150 μm . Menší částice je obtížné zachytit a navíc kladou větší odpor protékající kapalině. Částice větší mohou v průtokovém systému uvíznout a vytvořit zátku. Není nezbytně nutné, aby byla velikost částic zcela stejná, zvláště když optické vlákno průtokové cely spojuje odezvu velkého počtu částic do jednoho signálu.

Dále jsou preferovány mikročástice z měkkých polymerů, jelikož tvrdé (ze skla, nebo siliky) mohou poškrábat ventil [7].

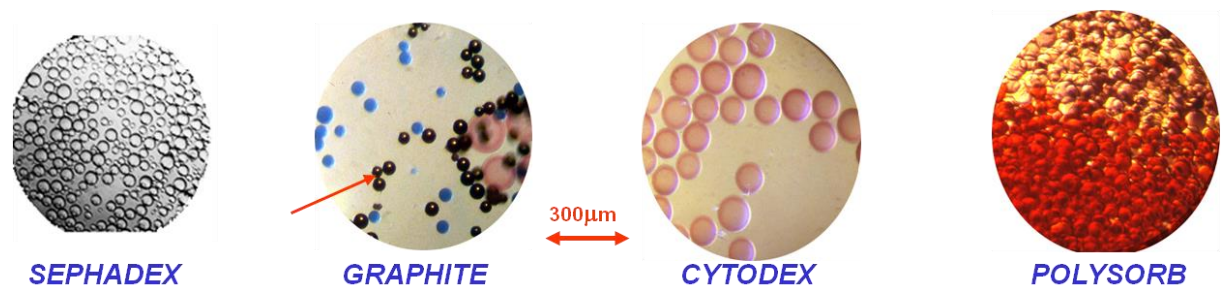
Pro BI spektroskopii je navíc požadována čistota částic, to splňují materiály **Sephadex** a **Sepharosa**, které jsou pro BI aplikace ideální, jsou průhledné a mohou být monitorovány UV - VIS a fluorescenčně. Mikročástice z těchto materiálů jsou dostupné s širokou škálou navázaných funkčních skupin, např. iontově výměnné, C - 18, protein A. Mohou být použity také pro analýzu anorganických vzorků, pro zakoncentrování analytů ve stopových množstvích a pro selektivní záchyt biomolekul, jako jsou antigeny a protilátky [7].

Mechanické vlastnosti jednoho materiálu se mohou odlišovat, např. částice Sepharosy 4B jsou elastičtější než 6B, které jsou více zesíťované.

Cytodexové částice jsou velmi jemné a křehké, mohou být použity jako nosiče pro živé buňky při fluorescenční mikroskopii.

Grafitové částice jsou velmi pevné, byly použity jako obnovitelný elektrodový materiál pro voltometrii u enzymových analýz.

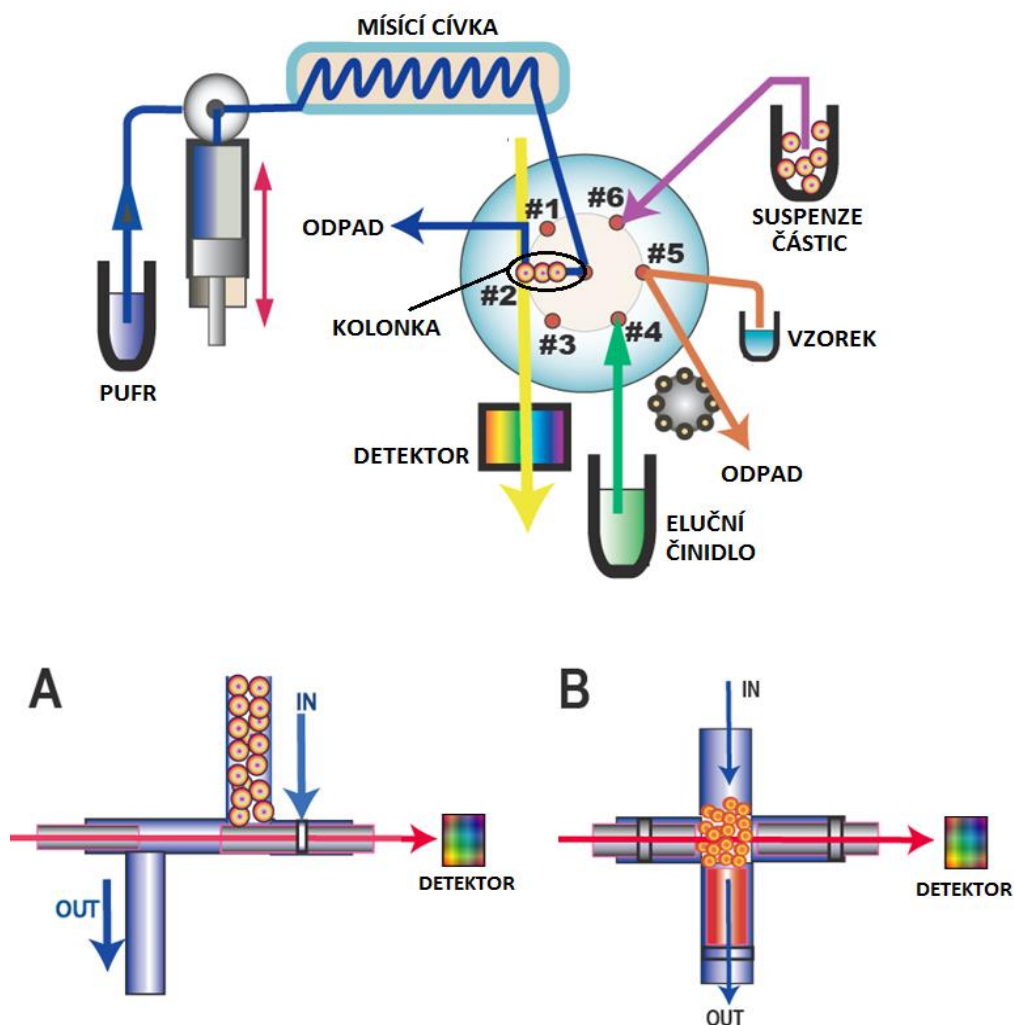
Obvyklé množství částic tvořících kolonku je od 2 do 10 μl , což odpovídá průměrně 2 000 – 10 000 částic [7].



Obrázek č. 10: Vzhled mikročástic z různých materiálů. Převzato a upraveno dle [7].

3.4.2 Schéma přístroje pro BI analýzu ve formátu LOV

LOV (Lab On Valve), laboratoř na ventilu znamená, že hlavní část analýzy se odehrává přímo uvnitř vícecestného ventilu, jak je znázorněno na následujícím obrázku (č. 11) [7, 12].



Obrázek č. 11: Schéma přístroje pro BI analýzu ve formátu LOV. Suspenze částic je zpětným tokem o vysoké průtokové rychlosti aspirována přes port #6 do míšící cívky. Poté je ventil přepnut do polohy #2 (na obrázku) a částice jsou dopraveny do místa, kde dojde k jejich nashromáždění a vytvoření chromatografické kolony díky optickému vláknu, které vytvoří její dno. Transport částic je prováděn při střední průtokové rychlosti (při nízké průtokové rychlosti nedochází ke stabilnímu usazení kolony). Následně je ventil přepnut do polohy #5, zpětným tokem dojde k aspiraci vzorku a po přepnutí do polohy #2 je roztok vzorku protlačen nízkou průtokovou rychlostí skrz vytvořenou kolonu, kde dojde k zachycení analytu na povrch jednotlivých mikročástic. Poté je ventil přepnut do polohy #4, zpětným tokem dojde k aspiraci elučního činidla a po přepnutí do polohy #2 je toto činidlo tlačeno skrz kolonu, čímž dojde k uvolnění analytu z vazby na sférické částice a jeho postupu do průtokové cely, jejíž okraje jsou tvořeny optickými vlákny (jedno jako zdroj záření, druhé vstupuje do detektoru).

Typy průtokových cel. A – průtoková cela používaná k detekci analytů po eluci, kdy dochází k obnově chromatografické kolony; B – průtoková cela vhodná pro BI spektroskopii. Převzato a upraveno dle [7].

3.4.3 Možné problémy u BI techniky

- částice mohou ucpat průtokový systém
- určit přesné množství částic aplikovaných do systému je obtížné
- hustota vytvořené „kolonky“ nemusí být vždy stejná
- může dojít k nechtěnému přesunu částic do jiných částí systému a následné kontaminaci dalších vzorků
- nemusí se podařit kompletní odstranění částic z průtokové cely
- kvůli nejednotnosti světelné absorpce pevných částic není spektroskopické měření zcela spolehlivé [7].

Vhodně vyvinutá a spolehlivá SIA metoda tyto problémy minimalizuje.

3.4.4 Aplikace BI technik

Techniky založené na mikročásticích je možné aplikovat v mnoha oborech. Podtržené metody jsou podrobně rozebrány níže.

- **Biochemie:** bioligandové metody, DNA metody, enzymatické metody, metody pro detekci patogenů, mikroafinitní chromatografie
- **Monitorování životního prostředí:** detekce těžkých kovů, radionuklidů apod.
- **Oceánografie:** detekce živin, kontaminant
- **Farmakologie:** metody zkoumání buněčného metabolismu, redoxních procesů v živých buňkách, studium buněčných receptorů a jejich ovlivňování
- **Biotechnologie:** imunoanalytické metody, DNA metody, monitorování imobilizace proteinů v reálném čase, monitorování vazebné kapacity a kinetiky chromatografických technik [7].

Imunoanalytické metody


Imunoanalytické metody jsou metody založené na reakci **antigen – protilátka** (Ag – Ab). Protilátka, speciálně připravená k navázání určitého antigenu (tedy požadovaného analytu) je uchycena na povrch sepharosových mikročástic. Tyto částice jsou umístěny v systému tak, že vytvoří kolonku mezi dvěma optickými vlákny.

Po průchodu vzorku skrz kolonku dojde k zachycení analytu (antigenu) na povrchu mikročástic. Skrz částice prochází záření (UV – VIS), jehož zeslabení (díky navázaným analytům) zachycuje detektor [7].

Nativní proteiny jsou monitorovány UV spektrofotometrií v rozsahu vlnových délek 220 – 280 nm. Značené biomolekuly mohou být monitorovány také VIS spektrofotometrií nebo fluorescenčně [7].

Příkladem takovéto bioligandové metody je **stanovení značeného inzulínu** (obrázek č. 12).



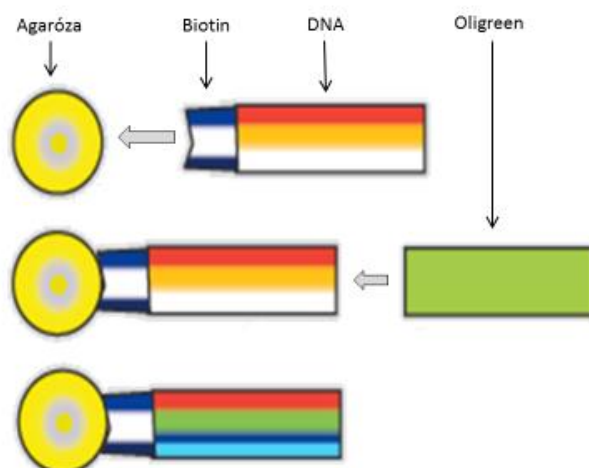
Obrázek č. 12: Bioligandová metoda pro stanovení inzulínu (). Částice jsou zachyceny v systému, následně je vstříknuta protilátka a za ní inzulín → protilátka je uchycena na mikročásticích a na ní se váže inzulín. Převzato a upraveno dle [7].

Bioligandové metody

Jedním z principů bioligandových metod je tvorba vazby mezi **avidinem a biotinem**, na které je založena řada stanovení. Jedním z nich je stanovení DNA.

Jednořetězcová biotinylovaná DNA je zachycena agarózovými částicemi pokrytými streptavidinem (připraveny v průtokovém systému), následně dochází k její derivatizaci pomocí oligreenu (fluorescenčního barviva) a detekci fluorescenčního záření (obrázek č. 13). Nakonec musí být částice ze systému odstraněny, jelikož vazba avidin – biotin je neštěpitelná [7].

Cílem stanovení jednořetězcové DNA bylo určit aktivitu/přítomnost telomerázy (enzymu, který selektivně prodlužuje jedno vlákno DNA) [7].



Obrázek č. 13: Zachycení biotinylované DNA agarózovými částicemi pokrytými streptavidinem a následná derivatizace DNA fluorescenčním barvivem (oligreen). Převzato a upraveno dle [7].

Metody používané ve farmakologii

Použití živých buněk jako biosenzorů pro objasnění interakcí **receptor – ligand** umožňuje zkoumat receptory v jejich nativním stavu, což dělá tuto analýzu fyziologicky relevantní. Měřením buněčné odpovědi (jakou je např. uvolnění vápníku) může být určeno, že receptor, na který je navázán ligand, je funkční [7].

BI techniky byly použity k rozlišení řady antagonistů muskarinových receptorů. Bylo sledováno, do jaké míry antagonisté tlumí indukované vyplavení vápníku [7].

Studium buněčného metabolismu

Jedním ze sledovaných dějů buněčného metabolismu je **spotřeba glukózy**.

Mikročástice (z Cytoporu) s adherovanými myšími hepatocyty jsou vstříknuty do systému, kde vytvoří na určeném místě kolonku. Analýza spotřeby glukózy je založena na vzniku NADH z NAD (pomocí enzymu glyceraldehyd - 3P - dehydrogenázy). Průběh analýzy je monitorován v reálném čase absorbcí NADH při 340 nm. Analýza má lineární rozsah pro glukózu v koncentraci 0,1 – 5,6 mM [7].

3.5 SEKVENČNÍ INJEKČNÍ CHROMATOGRRAFIE

Sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography, SIC) je metoda vzniklá spojením dvou technologií: kapalinové chromatografie a sekvenční injekční analýzy. Kombinuje vysokou separační účinnost s širokou škálou možností programování průtoku [7, 13].

K výhodám SIC patří, že objemy a průtokové rychlosti vzorku a elučních činidel je možno různě programovat, vzorek lze před vlastní separací derivatizovat, pomocné operace, jakými jsou např. tvorba gradientu, kondicionování kolonky, nebo její promývání, lze urychlit, k SIC systému lze připojit další zařízení a klasický SIC přístroj stojí přibližně o polovinu méně než HPLC [7, 14].

3.5.1 Princip

Stejně jako u klasických chromatografických technik je SIC založena na programovatelném průtoku mobilní fáze, což umožňuje snadnou tvorbu elučního gradientu. Výsledkem je zjednodušení instrumentace a snížená spotřeba roztoků [13, 14].

Při většině analýz je do přístroje nejprve vpraven eluční roztok, do jehož zóny je pomocí reverzního toku aspirován vzorek. Vícecestný ventil je poté přepnut tak, aby vzorek putoval na kolonu, kde dojde k jeho separaci. [7].

Programování průtoku umožní zvolit objem vstříknutého vzorku a dovoluje předkolonovou derivatizaci, tvorbu elučního gradientu, urychlení regenerace kolony a její rychlejší promytí [7, 13].

3.5.2 Příklad a materiál

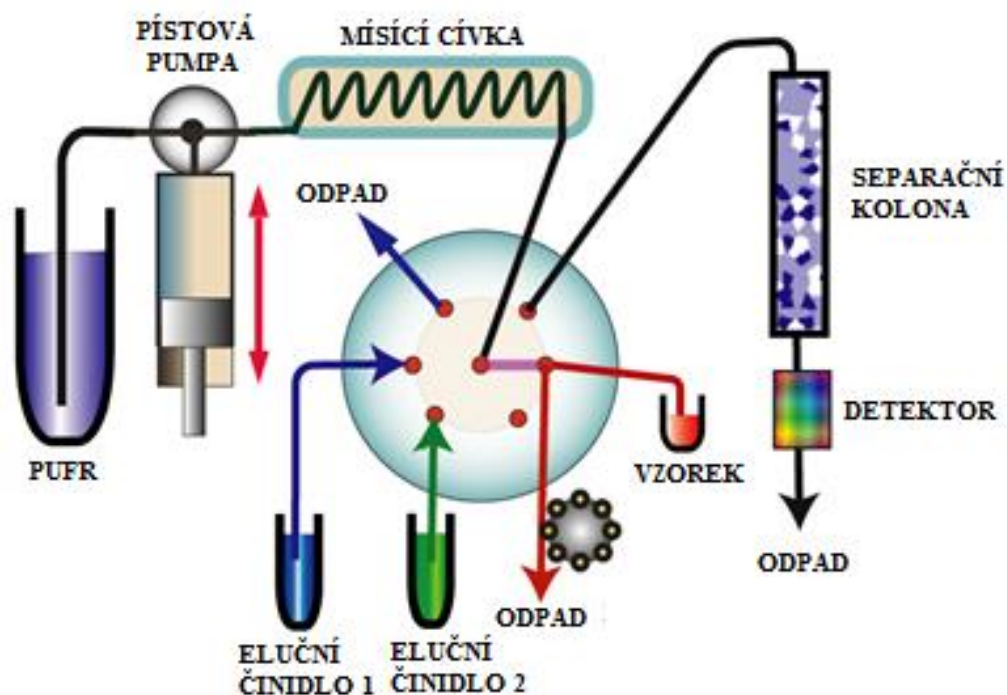
Příklad má jednoduchou konstrukci, hlavními komponentami jsou pístová pumpa a vícecestný ventil. Software umožňuje provádět veškeré úpravy v separačním procesu bez přestavování hardwaru přístroje. Vysoce spolehlivý motor pístové pumpy umožňuje přesné odměření objemů kapalin jak při klasickém, tak při zpětném toku a to do tlaku 3447 kPa a průtokové rychlosti 9 ml/min [7].

SIC používá externí chromatografickou kolonu, umístěnou mezi vícecestný ventil a detektor [14]. Detektor může být buď UV - VIS nebo fluorescenční a je rovněž umístěn externě [7]. Schéma SIC přístroje můžeme vidět na obrázku č. 14.

Chromatografická kolona, kompatibilní se separací při tlaku 3447 kPa, může být buď **monolitická**, nebo **částicová** [15].

Sol - gel monolitické kolony jsou tvořeny jako jediný kus porézního silikagelu, mají vyšší porozitu než klasické HPLC kolony. Nabízejí dobrou separační účinnost a nízký průtokový odpor (zpětný tlak), který je dán přítomností makropórů (~ 2 μm). Nejčastěji používané jsou monolitické kolony s reverzní fází, nachází široké uplatnění při separaci proteinů, oligonukleotidů, léčiv, organických kyselin a enantiomerů [7, 13].

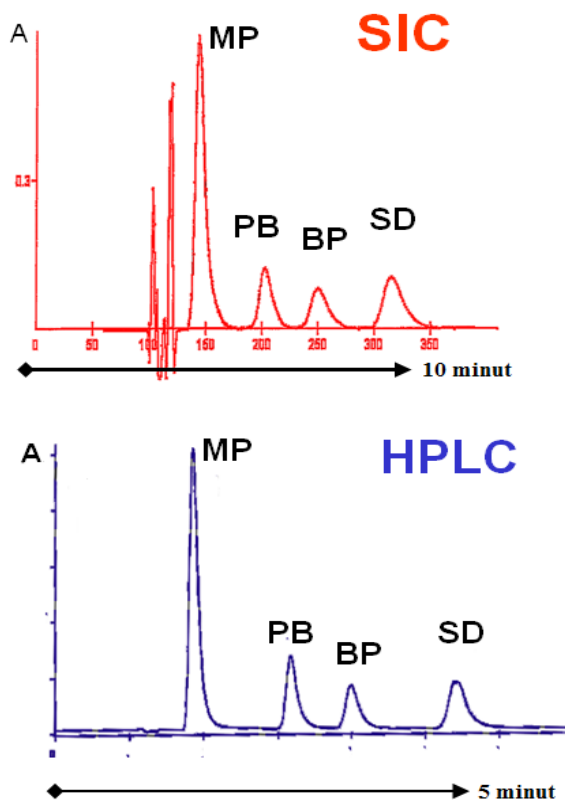
U částicových kolon je stacionární fáze tvořena pevnými sférickými jádry, která jsou pokrytá porézním silikagelem. Pevné jádro je pro analyty neprostupné zatímco porézní silikagelový obal je pokryt funkčními skupinami (C - 18, RP - Amid, fenyl - hexyl, HILIC aj.), které na sebe analyty váží. Tento typ kolon nedosahuje tak vysokého stupně porozity jako kolony monolitické, a tudíž vytváří vyšší zpětný tlak [7, 15].



Obrázek č. 14: Schéma SIC přístroje. Separační kolona i detektor jsou umístěny samostatně, mimo vícecestný ventil. Pístová pumpa zajišťuje jak klasický tok dopředu, tak i tok zpětný. Pufr zde slouží jako mobilní fáze. Vzorek je zpětným tokem aspirován do systému, poté putuje na kolonu, kde dojde k zadržení některých jeho složek. Následuje promytí kolony pufrém a poté aplikace elučního činidla, které uvolní analyty z vazby. Pro postupnou eluci strukturně podobných molekul z chromatografické kolony lze s výhodou využít eluční gradient, který lze získat mísením elučních činidel v různém poměru. Jednotlivé analyty jsou zaznamenány detektorem a vyhodnoceny v příslušném programu. Převzato a upraveno dle [7].

3.5.3 Porovnání SIC a kapalinové chromatografie

SIC poskytuje porovnatelnou účinnost separace jako HPLC (viz obrázek č. 15). Rozdíl spočívá v limitaci SIC hardwaru (maximální objem pístové pumpy, nízká tolerance zpětného tlaku, nízká gradientová schopnost), který předurčuje SI chromatografii dostačující pouze pro separaci menšího počtu složek směsi (cca 5) [7, 14].



Obrázek č. 15: Chromatogramy totožného vzorku, jednou analyzovaného pomocí SIC, podruhé pomocí HPLC. Zkratky: MP...methylparaben; PB...propylparaben; BP...butylparaben; SD...diklofenak sodný. Převzato a upraveno dle [7].

3.5.4 Další varianty SIC

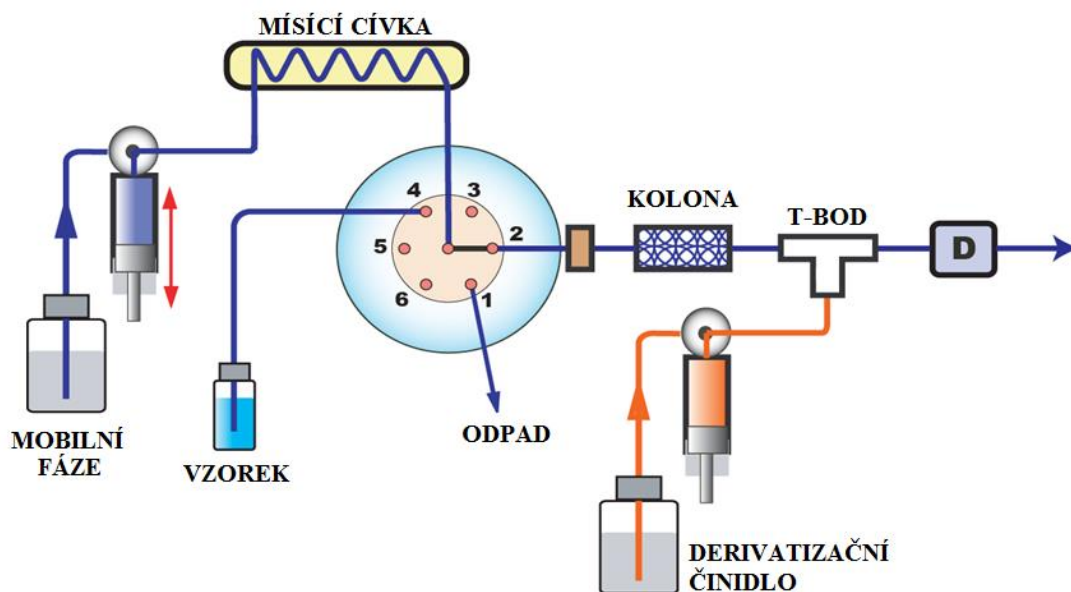
- **SIC na velmi krátkých kolonkách**

Velmi krátké kolony (10 – 50 mm) mohou být použity při velmi nízkém tlaku, takže jsou vhodné i pro FIA systém. Jsou ale schopny rozlišit pouze dvě až tři složky analyzované směsi [7, 16].

- **Sekvenční injekční iontově výměnná chromatografie**

- **Postkolonová derivatizace**

Vyžaduje kontinuální zásobení derivatizačním činidlem, a proto je nezbytné použít druhou nízkotlakou pumpu spojenou se systémem pomocí T - bodu, který je umístěn mezi kolonou a detektorem (znázorněn na obrázku č. 16). Tato metoda umožnila excelentní separaci opiátů a biogenních aminů v moči za použití chemiluminiscenční derivatizace a detekce [7].



Obrázek č. 16: Postkolonová derivatizace. Derivatizační činidlo je pomocí nízkotlaké pumpy hnáno přes T - bod do systému, kde reaguje s analyty, které vycházejí z kolony rozseparované. Cílem této derivatizační reakce je zajistit produkty, které budou snáze detekovatelné. Převzato a upraveno dle [7].

- **Předkolonová derivatizace**

K derivatizační reakci dochází ještě před vstupem analytů na kolonu. Cílem je upravit jejich vlastnosti tak, aby byly na zvoleném sorbentu dobře oddělitelné.

- **Eluční gradient**

Počáteční dávka slabého elučního činidla je aspirována do mísící cívky, uvnitř které je již připraveno silné eluční činidlo. Dojde k jejich spojení a částečně i vzájemnému promíchání. Takto vzniklý eluční gradient je poté dopraven na kolonu, kde dochází k postupnému vymývání zachycených analytů. Jediná pumpa SIC systému je schopna pomocí programování průtoku vytvořit širokou škálu koncentračních gradientů [7].

3.6 EXTRAKCE NA TUHOU FÁZI

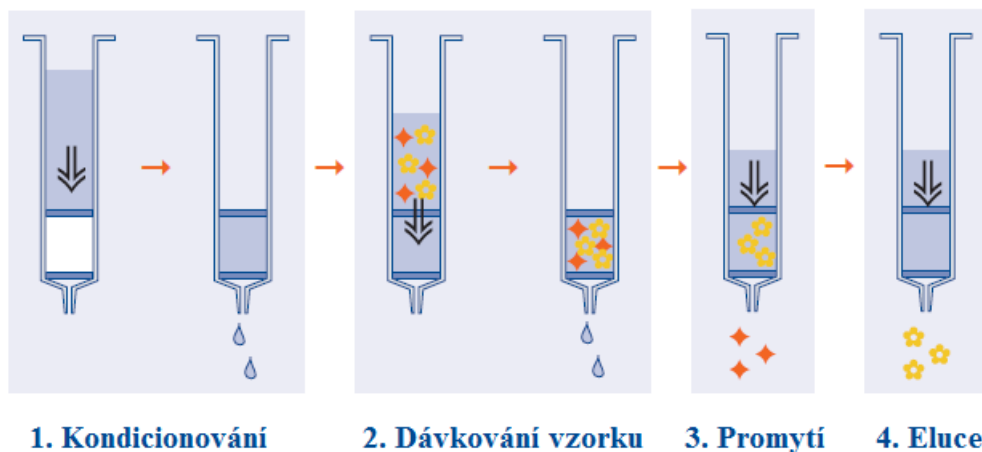
Extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction, SPE) je v současné době jednou z nejčastěji užívaných technik dostupných pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které se v důsledku mezimolekulových interakcí adsorbují na sorbent [17].

SPE často nahrazuje extrakci mezi dvěma kapalinami, jelikož výrazně snižuje spotřebu organických rozpouštědel a umožňuje zařadit proces separace do automatizovaného systému [7].

SPE je díky své univerzálnosti široce využívána, a to např. pro čištění látek, zakoncentrování stopových množství látek, převod analytu z jedné specifické matrice do jiné (např. z vodné do organické), derivatizaci (analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a poté eluován) [7, 18].

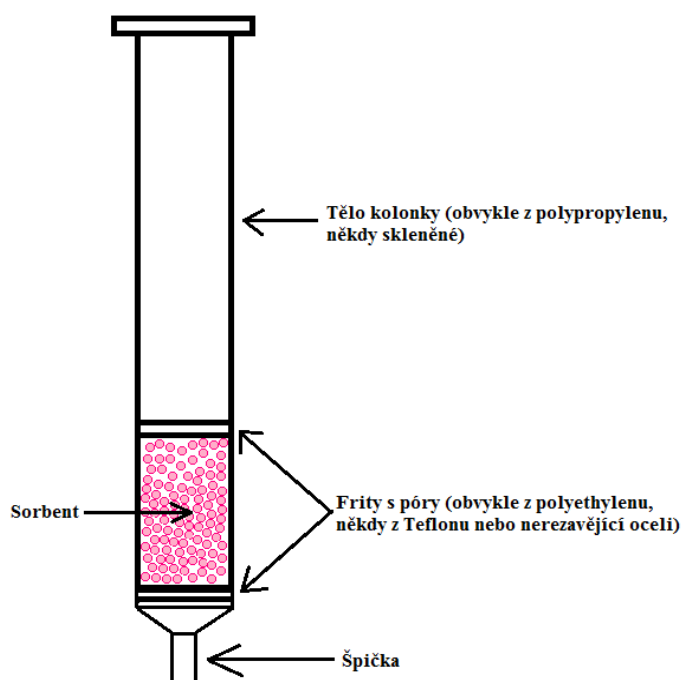
Existují dva hlavní principy SPE. Prvním a nejčastějším je adsorpce analytu na tuhou fázi, zatímco balastní látky vzorku protékají skrz sorbent pryč. Tento princip se využívá v případech, kdy je analyt přítomen ve vzorku pouze ve velmi nízké koncentraci. Druhý způsob je založen na zachycení balastních látek ze vzorku pevnou fází a průchodu analytu skrz sorbent bez zachycení. Tento přístup je volen v případě, že je kýžený analyt přítomen ve vzorku ve vysoké koncentraci [19].

Podrobnější popis prvního principu (obrázek č. 17): kapalný vzorek prochází přes SPE kolonku a požadované analyty jsou zachyceny materiálem sorbentu v koloně. Nežádoucí příměsi jsou z kolonky odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Nakonec jsou požadované analyty získány z kolonky pomocí elučního činidla v podobě vysoce čistého extraktu. Tento extrakt má vyšší koncentraci analytu, než původní vzorek [17, 19].



Obrázek č. 17: Postup u SPE. 1. Kondicionování (zvlhčení pevné fáze matricí vzorku), 2. Dávkování vzorku (vzorek prochází skrz pevnou fázi, kde dojde k zachycení analytů ze vzorku), 3. Promytí kolony (odstranění nežádoucích příměsí vhodným rozpouštědlem), 4. Eluce (uvolnění analytů z vazby na tuhou fázi a jejich vymytí). Převzato a upraveno dle [20].

Extrakce se provádí pomocí extrakčních kolonek (obrázek č. 18) o nejrůznějších velikostech a náplních sorbentů [17].



Obrázek č. 18: Extrakční kolonka. Do těla kolonky je aplikován roztok vzorku, ten protéká skrz sorbent. Na sorbentu se zachytí požadovaný analyt, vše ostatní proteče pryč. Po propláchnutí sorbentu je do těla kolonky aplikováno eluční činidlo, které při průchodu sorbentem uvolní analyt z vazby. Ten je následně zachycen do zkumavky. Celý proces je možno urychlit použitím centrifugy, vakua na výstupu kolonky nebo tlakem na vstupu kolonky. Převzato a upraveno dle [18, 21].

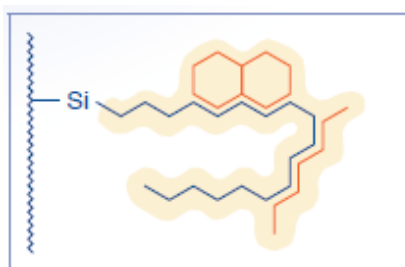
3.6.1 Sorbenty

Sorbenty jsou tvořeny částicemi o velikosti v průměru 50 μm , které kladou malý odpor protékající kapalině a v kolonce jsou uzavřeny pomocí frit.

SPE kolonky obsahují sorbenty založené nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Při této modifikaci se na povrchové silanolové skupiny chemicky navazují skupiny různých vlastností, které rozhodují o výsledných vlastnostech sorbentu (viz tabulky č. 1, 2 a 3). Část silanolových skupin lze ponechat volných [17].

3.6.1.1 Nepolární sorbent (sorbent s reverzní fází)





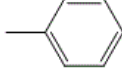

Nepolární sorbenty se vyznačují hydrofobními vlastnostmi. Analyty jsou na nich zadržovány pomocí hydrofobních interakcí (van der Waalsovy síly) [21], viz obrázek č. 19.



Obrázek č. 19: Retence nepolárního analytu (červeně) na nepolárním sorbentu (sorbentu s reverzní fází, modře). Převzato a upraveno dle [20].

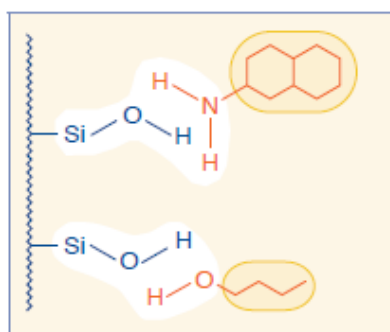
Lze je využít pro extrakci nepolárních a středně polárních sloučenin. Použití se podobá aplikaci reverzních fází u HPLC. Jako rozpouštědlo vzorku se používá polární kapalina (např. voda), ze které se nejselektivněji váží nejméně polární látky [17]. Jako eluční činidla se používají kapaliny s nižší polaritou než voda (např. methanol, dichlormethan, chloroform, hexan) [20]. Nejčastější funkční skupiny nepolárních sorbentů jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1: Funkční skupiny vyskytující se na nepolárních sorbentech. Nejčastějšími funkčními skupinami vyskytujícími se na nepolárních sorbentech jsou oktadecyl, oktyl, ethyl, cyklohexyl, fenyl a kyanopropyl. Převzato a upraveno dle [17].

Označení	Funkční skupina	-R
C18	oktadecyl	
C8	oktyl	
C2	ethyl	
CH	cyklohexyl	
PH	fenyl	
CN	kyanopropyl	

3.6.1.2 Polární sorbent

Polární sorbent je selektivní pro polární sloučeniny [17], ty jsou na něm zadržovány pomocí hydrofilních interakcí (vodíkové vazby, π - π interakce, vazba dipól - dipól, interakce dipól - indukovaný dipól) [21], viz obrázek č. 20.


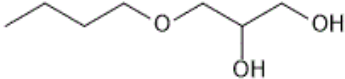



Obrázek č. 20: Retence analytů s polárními skupinami (červeně) na polárním sorbentu (modře). Převzato a upraveno dle [20].

Vzorek bývá většinou rozpuštěn v organické fázi. Jako eluční činidla se využívají polární rozpouštědla (v porovnání s rozpouštědlem vzorku), jako např. ethery, ketony, chloroform, dichlormethan aj. [20].

Tabulka č. 2 uvádí nejčastěji se vyskytující funkční skupiny na polárních sorbentech. U prvních dvou zde uvedených skupin se sekundárně uplatňuje iontová výměna, protože silanolová skupina je slabě kyselá a vyměňuje kationty a aminopropylová skupina slabě zásaditá a vyměňuje anionty. Aktivní silanolové skupiny velmi ochotně zachycují vlhkost ze vzduchu, proto se musí kolonky uchovávat v suchém prostředí [17].

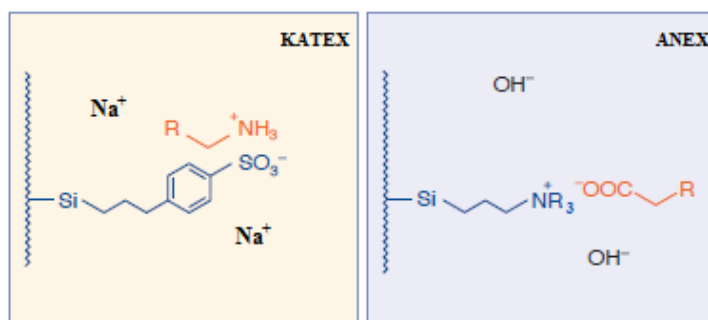
Tabulka č. 2: Funkční skupiny vyskytující se na polárních sorbentech. Nejčastějšími funkčními skupinami vyskytujícími se na polárních sorbentech jsou silanol, aminopropyl, 3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl a kyanopropyl. Převzato a upraveno dle [17].

Označení	Funkční skupina	-R
Silika	silanol	—OH
NH ₂	aminopropyl	
DIOL	3-(2,3-dihydroxypropoxy)propyl	
CN	kyanopropyl	

3.6.1.3 Iontově výměnný sorbent

Iontově výměnné sorbenty rozdělujeme na aniontově výměnné (anexy) a kationtově výměnné (katexy) a každý z nich ještě dále na silný a slabý.

Na iontově výměnném sorbentu dochází k zadržení analytu pomocí iontových interakcí typu elektrostatických přitažlivých sil [21, 22], viz obrázek č. 21.



Obrázek č. 21: Iontově výměnné sorbenty. Sorbent typu KATEX (aniont, modře) na sobě zadržuje analyty (kationty, červeně) výměnou za svůj kationt (zde Na⁺, černě). Sorbent typu ANEX (kationt, modře) na sobě zadržuje analyty (anionty, červeně), výměnou za svůj aniont (zde OH⁻, černě). Převzato a upraveno dle [20].

Funkční skupiny vyskytující se na iontově výměnných sorbentech jsou uvedeny v tabulce č. 3.

Tabulka č. 3: Funkční skupiny vyskytující se na iontově výměnných sorbentech. Nejčastějšími funkčními skupinami vyskytujícími se na iontově výměnných sorbentech jsou aminopropyl, trimethylamoniumpropyl, karboxypropyl, kyselina benzensulfonová a kyselina propansulfonová. Převzato a upraveno dle [17].

Označení	Funkční skupina	-R
NH2	aminopropyl	
SAX	trimethylamoniumpropyl (kvarterní amin)	
CBA	karboxypropyl	
SCX	benzensulfonová kyselina (4-sulfofenyl)	
PRS	propansulfonová kyselina (3-sulfopropyl)	

3.6.1.3.1 Aniontově výměnné sorbenty (anexy)

Anexy dělíme na silné (SAX) a slabé (WAX).

SAX (Strong Anion Exchanger, silný měnič aniontů)

Silný aniontový měnič obsahuje alifatické kvarterní amoniové skupiny, které jsou navázány na povrchu siliky. Kvarterní amin je silná base a vyskytuje se jako pozitivně nabitý kationt, který přitahuje záporně nabitě molekuly analytu z roztoku. Jelikož je pKa kvarterního aminu velmi vysoké (více než 14), je jeho funkční skupina nabitá při všech hodnotách pH vodných roztoků [21].

SAX je používán pro izolaci silných aniontů (velmi nízké pKa, <1) nebo slabých aniontů (nízké pKa, >2), pokud jsou při pH svého roztoku nabitě. Aby byly anionické (kyselé) analyty nabitě, musí být pH jejich matrice o 2 jednotky vyšší, než jejich hodnota pKa. Ve většině případů jsou analyty silné nebo slabé kyseliny [21].

Protože SAX váže velmi silně, je používán k extrakci silných aniontů, pouze pokud není požadována jejich následná eluce (složka se naváže na sorbent a poté je i se sorbentem vyhozena). Nejčastěji se tedy používá pro extrakci **slabých aniontů** [21].

Slabé anionty mohou být uvolněny z vazby na sorbent buď vytěsněním jiným aniontem, nebo elucí kyselým roztokem o pH, které slabý anion neutralizuje (pH o 2 jednotky nižší než pKa aniontu) [21].

Pokud je požadována eluce silně anionických analytů, používá se jako sorbent WAX [21].

WAX (Weak Anion Exchanger, slabý měnič aniontů)

Jako slabý měnič aniontů se ve vodných roztocích používá alifatická aminopropyllová skupina navázaná na povrch siliky (NH₂). Aby mohla být primární aminoskupina, jejíž pKa je okolo 9,8, použita jako měnič aniontů, musí být nanášený vzorek v roztoku, jehož pH je alespoň o 2 jednotky nižší než 9,8. Mimoto se musí pH

vzorku nacházet v hodnotách, při kterých jsou analyty typu aniontů nabitě (pH o 2 jednotky vyšší než pKa analytů) [21].

WAX je používán k izolaci a získání **jak silných tak slabých aniontů**, protože primární amin může být neutralizován (roztokem, jehož pH je o 2 jednotky vyšší než pKa sorbentu), a tím dojde k vymytí jak silného, tak i slabého aniontu. Slabé anionty mohou být také eluovány roztokem, který neutralizuje adsorbované anionty (s pH o 2 jednotky nižším než pKa aniontů), nebo přidáním jiného aniontu, který nahradí analyt [21].

3.6.1.3.2 Kationtově výměnné sorbenty (katexy)

Katexy dělíme na silné (SCX) a slabé (WCX).

SCX (Strong Cation Exchanger, silný měnič kationtů)

Silný měnič kationtů obsahuje siliku, na kterou jsou vázány skupiny alifatických sulfonových kyselin. Sulfoskupina je silně kyselá (pKa <1) a přitahuje kationické molekuly z kontaktního roztoku. Je nabitá v celém rozsahu pH a proto může být použita pro izolaci silných (velmi vysoké pKa, >14) i slabých kationtů (středně vysoké pKa, <12), pokud jim pH roztoku umožňuje, aby měly náboj. Aby byly kationické (bazické) analyty nabitě, musí být pH matrice o 2 jednotky nižší než je jejich pKa. Ve většině případů jsou analyty silné nebo slabé baze [21].

SCX sorbenty se používají nejčastěji pro izolaci **slabých kationtů**, pro izolaci silných kationtů pouze v případě, že není požadována jejich následná eluce. Slabé kationty mohou být ze sorbentu eluovány pomocí roztoku, který má pH o 2 jednotky vyšší než je pKa kationtu (neutralizace kationtu). Nebo mohou být uvolněny přidáním jiného kationtu, který analyt vytěsňuje [21].

Pokud požadujeme vymytí silných kationických analytů, použijeme WCX [21].

WCX (Weak Cation Exchanger, slabý měnič kationtů)

Základem slabého měniče kationtů je silika, na níž jsou navázány skupiny alifatických karboxylových kyselin. Karboxylová kyselina je slabý anion, a proto je považována za slabý měnič kationtů. Karboxylová funkční skupina má pKa okolo 4,8 a je negativně nabitá v roztocích, jejichž pH je alespoň o 2 jednotky vyšší, než hodnota 4,8, a váže kationty, které jsou při takovémto pH rovněž nabité [21].

WCX je používán pro izolaci a následnou eluci **jak silných tak slabých kationtů**, protože karboxylová funkční skupina může být neutralizována (roztokem s pH o 2 jednotky nižším než pKa sorbentu), čímž dojde k vymytí silných i slabých kationtů. Slabé kationty mohou být také eluovány pomocí roztoku (s pH o 2 jednotky vyšším než je pKa kationtu), který neutralizuje adsorbovaný kation, nebo přidáním jiného kationtu, který vytěsni analyt [21].

Analyt je z SPE sorbentu ve většině případů získán ve vodném roztoku. Pokud musí být k vymytí analytu z SPE kolonky použit kyselý nebo bazický roztok, ale získaný vzorek má být dále analyzován v organickém rozpouštědle, které není mísitelné s vodou, sloučenina se eluuje okyseleným methanolem (98 % methanol/2 % koncentrovaná HCl) nebo methanolem s přidavkem zásady (98 % methanol/2 % NH₄OH). Methanol je rychle odpařen a vzorek může být následně rekonstituován v jiném rozpouštědle. Pokud je potřeba silnější nepolární rozpouštědlo pro vymytí analytu z SPE sorbentu, lze do okyseleného nebo bazického methanolu přidat methylenchlorid, hexan nebo ethylacetát [21].

4 Praktická část

4.1 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- Analytické váhy Sartorius Analytic A200S
- Digitální pH metr Hanna instruments pH212
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Bandelin RK - 100
- UV - lampa Analytical Instrument Systems, Inc., D1030 CE
- Průtokový systém FaFSIA – pístové čerpadlo CAVRO XL 3000 (objem 2,50 ml), Vici Valco vícecestný ventil, mísící cívka (objem 1,20 ml)
- Software FaFSIA (LabView)
- Spektrofotometrický detektor Ocean Optics USB2000 – UV - VIS
- Dvoupolohový ventil na přepnutí kanálu (ruční ovládání) VICI
- Hadičky teflonové - vnitřní průměr 0,50 a 0,75 mm, Upchurch Scientific
- Automatické pipety Biohit 10,00 - 100,00 μ l a 100,00 - 1000,00 μ l
- Automatické pipety Transferpette S, 500,00 – 5000,00 μ l a 100,00 - 1000,00 μ l
- Skleněné odměrné baňky Simax 5,00 ml, 10,00 ml, 25,00 ml
- Odměrný válec Simax, 100,00 ml
- Kádinky Simax, 100,00 ml
- Skleněné uzavíratelné lahve Fisherbrand 100,00 a 250,00 ml
- Zkumavky Eppendorf (Safe Lock Tubes) 1,50 a 2,00 ml
- Sorbent Sephadex QAE - A25, Sigma - Aldrich
- Sorbent Discovery DSC - SAX SPE, Supelco, Sigma - Aldrich
- Sorbent AccuBOND[II] SAX, Agilent
- Sorbent Iontosorb TMAHP 100, Iontosorb, Ústí nad Labem

4.2 CHEMIKÁLIE

- Kyselina sinapová (3,5-dimethoxy-4-hydroxycinnamic acid), 99,00 %, Cat.: D13,460-0, Sigma - Aldrich
- Kyselina protokatechová (3,4-dihydroxybenzoic acid), 97,00 %, Cat.: D10,980-0, Sigma - Aldrich
- Kyselina kávová (*trans*-3,4-dihydroxycinnamic acid), 97,00 %, Cat.: D11,080-9, Sigma - Aldrich
- Kyselina *o*-kumarová (*trans*-*o*-hydroxycinnamic acid), 97,00 %, Cat.: H2,280-9, Sigma - Aldrich
- Kyselina syringová (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid), 98,00 %, Cat.: S-6881, Sigma - Aldrich
- Kyselina ferulová (4-hydroxy-3-methoxycinnamic acid), 99,00 %, Cat.: WA20122, Sigma - Aldrich
- Kyselina octová ledová, 99,00 %, č.š.: 1610101011, Penta
- Kyselina *o*-fosforečná, 85,00 %, K43367273, Merck
- Kyselina chlorovodíková, 37,00 %, CASNo.: 7647-01-0, Sigma - Aldrich
- Octan amonný, 98,00 %, č.š.: 30397, Balex Pardubice Rosice
- Acetonitril, CHROMASOLV® Plus, pro HPLC, ≥ 99,90 %, Sigma - Aldrich
- Metanol, CHROMASOLV® Plus, pro HPLC, ≥ 99,90 %, Sigma - Aldrich
- Ethanol 85,00 % denaturovaný methanolem
- Voda ultračistá, Millipore

4.3 CHARAKTERISTIKA SORBENTŮ

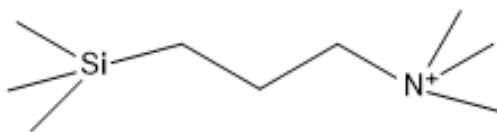
4.3.1 Charakteristika sorbentu Sephadex QAE - A25

Sorbent Sephadex QAE - A25 je silný aniontový měnič (anex), založený na dobře prozkoumané a vyzkoušené matrici Sephadexu (tvořena zesíťným dextrans – polymer glukózy).

Ligandem (aktivní iontoměničovou skupinou) je diethyl-(2-hydroxypropyl)aminoethyl. Velikost částic se pohybuje v rozmezí 40 - 120 μm . Je stabilní při pH 2 - 12 v běžně používaných vodných pufrch [23]. A25 značí stupeň porozity 25 Å [24].

4.3.2 Charakteristika sorbentu Discovery DSC - SAX SPE

Sorbent Discovery DSC - SAX SPE je silný aniontový měnič (anex), který je tvořen polymerně vázanými kvarterními aminy na siliku (obrázek č. 22). Je pozitivně nabitý v celém rozpětí pH. Často používán pro extrakci slabých aniontů (jako např. karboxylových kyselin), které by se nemusely dostatečně silně vázat na slabé aniontové měniče. Je stabilní ve vodných i organických rozpouštědlech. Velikost částic 50 μm a porozita 70 Å [25, 26].



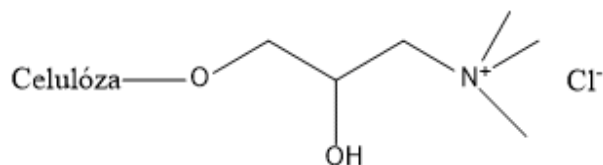
Obrázek č. 22: Sorbent Discovery DSC - SAX SPE. Tvořen kvarterními aminy, pozitivně nabitými v celém rozsahu pH. Převzato a upraveno dle [25].

4.3.3 Charakteristika sorbentu AccuBOND[II] SAX

Sorbent AccuBOND[II] SAX je silný aniontově výměnný sorbent (anex), kdy je na siliku vázána kvarterní amoniová sůl. Stejná funkční skupina jako DSC - SAX, velikost částic 50 μm a porozita 60 Å [20, 27].

4.3.4 Charakteristika sorbentu Iontosorb TMAHP 100

Sorbent Iontosorb TMAHP 100 je silný aniontově výměnný sorbent (anex), založený na celulóзовých částicích substituovaných trimethylamino-2-hydroxypropylóvými skupinami (obrázek č. 23). Velikost částic 50 - 80 μm a porozita 100 Å [28].



Obrázek č. 23: Sorbent Iontosorb TMAHP 100. Převzato a upraveno dle [28].

4.4 CHARAKTERISTIKA KYSELIN (ZKOUŠENÝCH VZORKŮ)

4.4.1 Kyselina ferulová

pKa = 4,58; absorpční maxima: 325 a 240 nm

4.4.2 Kyselina o-kumarová

pKa = 4,04; absorpční maxima: 325 a 270 nm

4.4.3 Kyselina protokatechová

pKa = 2,56; absorpční maxima: 260 a 295 nm

4.4.4 Kyselina syringová

pKa = 3,93; absorpční maxima: 280 nm

4.4.5 Kyselina sinapová

pKa = 3,61; absorpční maxima: 325 a 240 nm

4.4.6 Kyselina kávová

pKa = 3,14; absorpční maxima: 325 a 240 nm

4.5 PŘÍPRAVA SUSPENZE A ROZTOKŮ

4.5.1 Příprava suspenze sorbentů

(Sephadex QAE - A25, Discovery DSC - SAX SPE, AccuBOND[II] SAX, Iontosorb TMAHP 100)

⇒ 250,00 µg sorbentu v suchém stavu + 3,00 ml H₂O

Do vialky bylo naváženo 250,00 µg sorbentu (4 vialky pro různé 4 sorbenty) a přidány 3,00 ml ultračisté vody. Vznikla tak suspenze pevných částic sorbentu.

4.5.2 Příprava pufrů

4.5.2.1 A) promývací pufr

- Příprava zásobního roztoku pufru octanu amonného o koncentraci 2,00 mol/l:

⇒ 15,42 g octanu amonného → 100,00 ml H₂O

Do skleněné lahve se šroubovacím víčkem bylo naváženo 15,42 g octanu amonného a rozpuštěno ve 100,00 ml ultračisté vody (4 lahve pro 4 rozdílné hodnoty pH). Následně bylo u každého roztoku octanu amonného upraveno pH pomocí ledové kyseliny octové, vznikly tak 4 zásobní pufrы o 4 rozdílných hodnotách pH (pH = 5,0, pH = 6,0, pH = 7,0, pH = 8,5). Tyto zásobní roztoky byly dále ředěny, čímž vznikly pracovní roztoky promývacího pufru.

- Ředění zásobního roztoku pufru 2,00 mol/l (→ vzn. pracovní roztok promývacího pufru o koncentraci 0,05 mol/l):

⇒ 2,50 ml zásobního roztoku pufru + 97,50 ml H₂O

Do skleněné lahve se šroubovacím víčkem bylo odměřeno 2,50 ml zásobního roztoku pufru a doplněno 97,50 ml ultračisté vody (4 lahve pro 4 rozdílné hodnoty pH).

4.5.2.2 B) eluční pufr

Do skleněné lahve se šroubovacím víčkem bylo odměřeno 100,00 ml ultračisté vody a následně upraveno pH (3 lahve pro 3 rozdílné hodnoty pH). Úprava pH na 2,5 pomocí ledové kyseliny octové, na pH = 2,0 pomocí kyseliny fosforečné a na pH = 1,5 pomocí kyseliny chlorovodíkové.

4.6 PŘÍPRAVA VZORKŮ KYSELIN

(kys. ferulová, syringová, sinapová, kávová, protocatechová, o-kumarová)

Pracovní roztoky kyselin byly připraveny v postupně se snižující koncentraci 10,00 – 0,50 $\mu\text{g/ml}$.

- Příprava zásobního roztoku kyseliny:

⇒ 25,00 mg → 25,00 ml H₂O (c = 1000,00 $\mu\text{g/ml}$)

Do 25,00 ml odměrné baňky bylo naváženo 25,00 mg standardu kyseliny (6 odměrných baněk pro 6 kyselin) a doplněno po rysku ultračistou vodou (s přídatkem asi 1,00 – 2,00 ml methanolu pro hůře rozpustné kyseliny). Tyto zásobní roztoky byly uchovávány v lednici.

- Ředění zásobních roztoků kyselin (→ vzn. pracovní roztoky kyselin):

⇒ 250,00 μl zásobního roztoku kyseliny → 25,00 ml H₂O (c = 10,00 $\mu\text{g/ml}$)

Do 25,00 ml odměrné baňky bylo odměřeno 250,00 μl zásobního roztoku kyseliny (6 odměrných baněk pro 6 kyselin) a doplněno po rysku ultračistou vodou. Vznikly tak roztoky o nejvyšší pracovní koncentraci 10,00 $\mu\text{g/ml}$ každé z kyselin, ty byly dále ředěny.

Např. pro přípravu vzorku kyseliny o koncentraci 5,00 $\mu\text{g/ml}$ bylo do zkumavky eppendorf o objemu 1,50 ml pipetováno 750,00 μl roztoku kyseliny o koncentraci 10,00 $\mu\text{g/ml}$ a 750,00 μl promývacího roztoku. Obdobně bylo postupováno i u dalších koncentrací, jak uvádí tabulky č. 4 a 5.

Tabulka č. 4: Klesající koncentrace pracovních roztoků kyselin: ferulové, syringové, sinapové, kávové, protokatechové a o-kumarové.

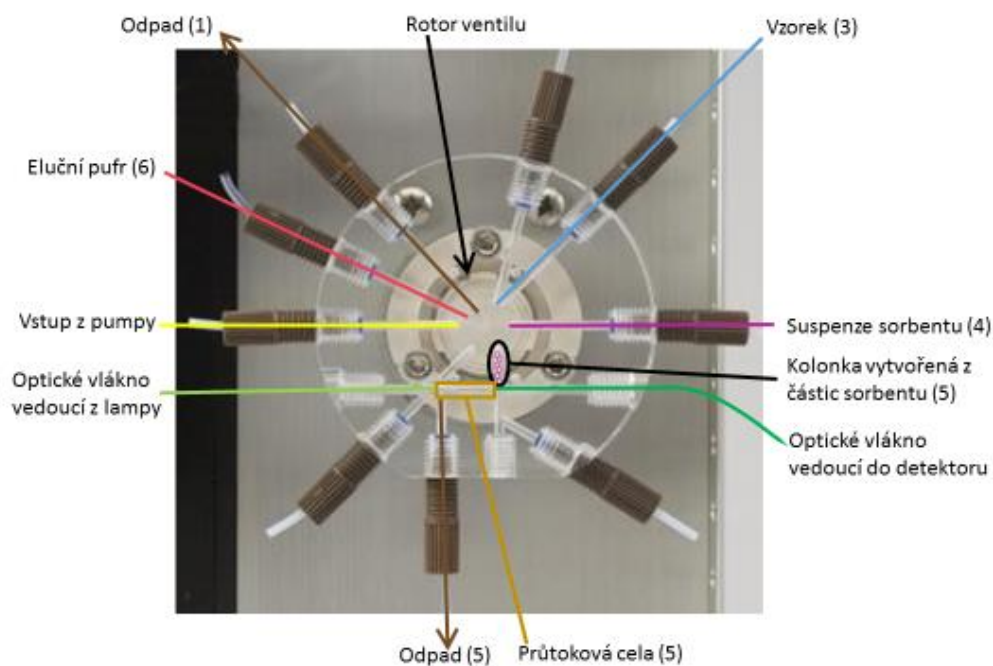
Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$] vzorku kyseliny	V [μl] roztoku o c = 10 $\mu\text{g/ml}$	V [μl] promývacího roztoku
5,000	750,00	750,00
2,500	375,00	1125,00
1,250	187,50	1312,50
0,625	93,75	1406,30

Tabulka č. 5: Klesající koncentrace pracovních roztoků kyselin: ferulové, syringové, sinapové, kávové, protokatechové a o-kumarové.

Koncentrace [$\mu\text{g/ml}$] vzorku kyseliny	V [μl] roztoku o c = 10 $\mu\text{g/ml}$	V [μl] promývacího roztoku
8,000	1200,00	300,00
6,000	900,00	600,00
4,000	600,00	900,00
2,000	300,00	1200,00
1,000	150,00	1350,00
0,500	75,00	1425,00

4.7 POPIS POUŽITÉHO PŘÍSTROJE

Průtokový systém FaFSIA, na kterém bylo měření provedeno, byl sestaven z pístové pumpy (o objemu 2,50 ml) opatřené dvoucestným ventilem, mísící cívkou (o délce 240,0 cm, průměru 0,8 mm a objemu 1,2 ml), osmicestným selekčním ventilem s nástavcem Lab – On - Valve (LOV, schematicky znázorněn na obrázku č. 24), UV - lampou, spektrofotometrickým detektorem, systémem teflonových hadiček a v neposlední řadě počítačem vybaveným softwarem FaFSIA (LabView).



Obrázek č. 24: Znárodnění LOV použité při měření. Na obrázku je vidět uspořádání laboratoře na ventilu, ve které se odehrává hlavní část analýzy. Označeny jsou jednotlivé vstupy (cesty) – pro vzorek, suspenzi sorbentu, eluční pufr a vstup z pístové pumpy. Můžeme vidět kolonku, vytvořenou přímo uvnitř ventilu (optické vlákno slouží jako záložka) a průtokovou celu, která je ohraničená z obou stran optickými vlákny, a ve které probíhá spektrofotometrická detekce.

4.8 POPIS PRŮBĚHU MĚŘENÍ

Nejprve byly připraveny pracovní roztoky jednotlivých kyselin v postupně se měnící koncentraci. Poté byla připravena suspenze vybraného sorbentu a promývací a eluční pufr (podle postupů uvedených výše).

System byl promyt promývacím pufrem a elučním pufrem (podle programu č. 1) a poté byla vytvořena kolonka ze suspenze sorbentu (podle programu č. 2).

Následně byla hadička, vedoucí od zkumavky se vzorkem do vícecestného ventilu, promyta roztokem vzorku (podle programu č. 3). Tato cesta (zkumavka se vzorkem – ventil) byla promyta s každým novým vzorkem.

Samotná analýza pak probíhala podle programu č. 4: byl dávkován vzorek, který se navázal na pevné částice sorbentu, a který byl následně z této vazby uvolněn pomocí elučního pufru o konkrétním pH. Takto uvolněný analyt byl při průchodu průtokovou celou zaznamenán spektrofotometricky při vlnových délkách 325 a 240 nm u kyseliny

ferulové, sinapové a kávové, při vlnových délkách 325 a 270 nm u kyseliny *o*-kumarové, 260 a 295 u kyseliny protokatechové a při 280 nm u kyseliny syringové.

Před další analýzou byla kolonka promyta novým promývacím pufrem o zvoleném pH (pomocí programu č. 5).

Na konci dne byla kolonka ze systému odstraněna programem č. 6 a celý systém promyt vodou (podle programu č. 7).

Vyskytla-li se v průběhu měření v průtokové cele vzduchová bublina, byla odstraněna pomocí programu č. 8.

Výše zmíněné programy jsou podrobně popsány v následujících tabulkách (č. 6 – 13).

Tabulka č. 6: Promytí systému před začátkem měření (program č. 1).

Program č. 1 – Promytí systému před začátkem měření		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 1000 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
5	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s
6	Dvoucestný ventil	Poloha IN
7	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 100 µl/s
8	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
9	Vícecestný ventil	Poloha 6 – eluční činidlo
10	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
11	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
12	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s

Tabulka č. 7: Vytvoření kolonky (program č. 2).

Program č. 2 – Vytvoření kolonky		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 1000 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 4 – suspenze sorbentu
5	Pumpa	Vytlačení 160 µl rychlostí 100 µl/s
6	Pumpa	Nasátí 260 µl rychlostí 100 µl/s
7	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
8	Pumpa	Vytlačení 500 µl rychlostí 20 µl/s
9	Vícecestný ventil	Poloha 1 - odpad
10	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 100 µl/s

Tabulka č. 8: Propláchnutí hadičky vedoucí ze zkumavky se vzorkem k ventilu (program č. 3).

Program č. 3 – Propláchnutí hadičky vedoucí ze zkumavky se vzorkem k ventilu		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 200 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 3 – vzorek
5	Pumpa	Nasátí 100 µl rychlostí 20 µl/s
6	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
7	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 30 µl/s

Tabulka č. 9: Měření (program č. 4).

Program č. 4 - Měření		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 1600 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 6 – eluční činidlo
5	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
6	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
7	Pumpa	Vytlačení 600 µl rychlostí 20 µl/s
8	Pumpa	Vytlačení 200 µl rychlostí 100 µl/s
9	Vícecestný ventil	Poloha 3 - vzorek
10	Pumpa	Nasátí 250 µl rychlostí 50 µl/s
11	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
12	Pumpa	Vytlačení 650 µl rychlostí 10 µl/s
13	Vícecestný ventil	Poloha 6 – eluční činidlo
14	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
15	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
16	Pumpa	Vytlačení 600 µl rychlostí 10 µl/s
17	Vícecestný ventil	Poloha 1 - odpad
18	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 100 µl/s

Tabulka č. 10: Promytí kolonky promývacím pufrem (program č. 5).

Program č. 5 – Promytí kolonky promývacím pufrem		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 200 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
5	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 30 µl/s

Tabulka č. 11: Odstranění kolonky (program č. 6).

Program č. 6 – Odstranění kolonky		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
5	Pumpa	Vytlačení 200 µl rychlostí 20 µl/s
6	Pumpa	Nasátí 200 µl rychlostí 20 µl/s
7	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
8	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 100 µl/s

Tabulka č. 12: Konečné promytí systému vodou (program č. 7).

Program č. 7 – Konečné promytí systému vodou		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 1000 µl VODY rychlostí 100 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
5	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s
6	Dvoucestný ventil	Poloha IN
7	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 100 µl/s
8	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
9	Vícecestný ventil	Poloha 6 – elučň činidlo → VODA
10	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
11	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
12	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s
13	Dvoucestný ventil	Poloha IN
14	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 100 µl/s
15	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
16	Vícecestný ventil	Poloha 3 – vzorek → VODA
17	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
18	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
19	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s
20	Dvoucestný ventil	Poloha IN
21	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 100 µl/s
22	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
23	Vícecestný ventil	Poloha 4 – suspenze sorbentu → VODA
24	Pumpa	Nasátí 300 µl rychlostí 50 µl/s
25	Vícecestný ventil	Poloha 1 – odpad
26	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 50 µl/s
27	Dvoucestný ventil	Poloha IN
28	Pumpa	Nasátí 500 µl rychlostí 50 µl/s
29	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
30	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
31	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 20 µl/s

Tabulka č. 13: Odstranění vzduchové bubliny (program č. 8).

Program č. 8 – Odstranění vzduchové bubliny		
Krok č.	Jednotka	Příkaz
1	Dvoucestný ventil	Poloha IN
2	Pumpa	Nasátí 1000 µl rychlostí 200 µl/s
3	Dvoucestný ventil	Poloha OUT
4	Vícecestný ventil	Poloha 5 – průtoková cela
5	Pumpa	Vytlačení 200 µl rychlostí 200 µl/s
6	Pumpa	Zadržení, prodlení 2 s
7	Pumpa	Vytlačení 100 µl rychlostí 200 µl/s
8	Pumpa	Zadržení, prodlení 1 s
9	Pumpa	Vytlačení 200 µl rychlostí 200 µl/s
10	Pumpa	Zadržení, prodlení 2 s
11	Pumpa	Vyprázdnění rychlostí 200 µl/s

5 Výsledky

5.1 KYSELINA FERULOVÁ NA 4 RŮZNÝCH SORBENTECH, ZA RŮZNÝCH PODMÍNEK

Nejprve byly měřeny pouze roztoky standardu kyseliny ferulové o různých koncentracích (10,000 – 0,625 µg/ml). Cílem bylo zjistit, který sorbent a za jakých podmínek bude pro její budoucí analýzu ze směsného vzorku nejlepší.

V níže uvedených tabulkách (č. 14 – 21) je stručně a jednoduše shrnuto, jak se který sorbent choval při měnících se hodnotách pH promývacího a elučního pufru. Na první pohled by se mohlo zdát, že při nástřiku vzorku do systému není hodnota pH (1,5, 2,0 a 2,5) elučního pufru podstatná, ale podíváme-li se do programu č. 4 (tabulka č. 9), vidíme, že před aplikací vzorku na kolonku dochází k promytí kolonky nejenom promývacím pufrem, ale také pufrem elučním, což může ovlivnit míru následného zachycení vzorku na sorbentu. Míra eluce vzorku ze sorbentu je rovněž ovlivněna jak hodnotou pH elučního pufru, tak i hodnotou pH promývacího pufru.

Prvním testovaným sorbentem byl sorbent TMAHP.

Sorbent: **TMAHP – nástřik**

Tabulka č. 14: TMAHP – nástřik.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✓	✓	–	✓
	2,0	✗	✓	✗	–
	2,5	✗	✓	✗	✓

LEGENDA:

- ✓ výborný záchyt vzorku na sorbentu
- dostatečný záchyt vzorku na sorbentu
- ✗ nedostatečný záchyt vzorku na sorbentu

Sorbent: **TMAHP – eluce**

Tabulka č. 15: TMAHP – eluce.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✗	✗	✗	–
	2,0	✓	✗	✓	✗
	2,5	✓	✗	✓	–

LEGENDA:

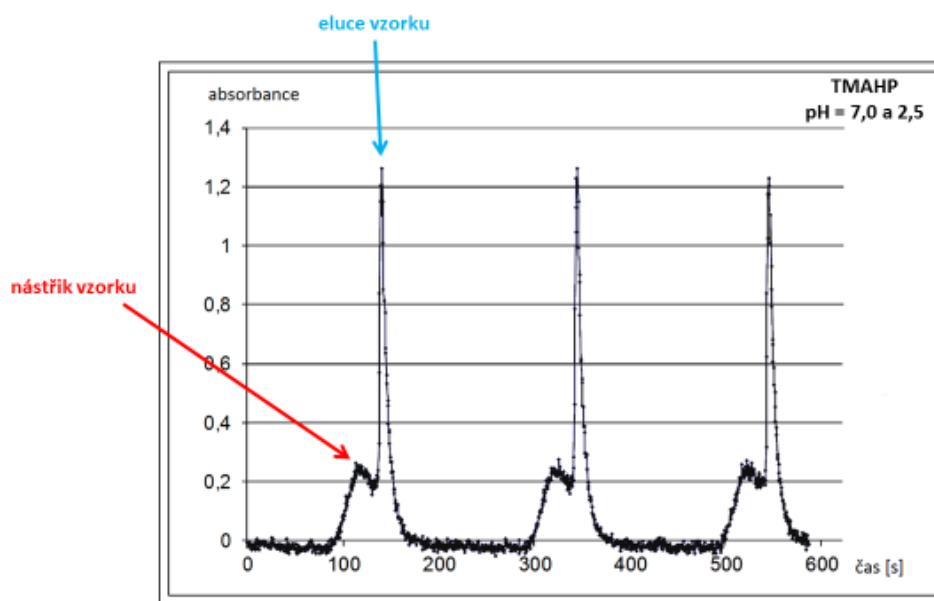
- ✓ výborná eluce
- dostatečná eluce
- ✗ nedostatečná eluce

Z tabulky č. 15 můžeme vyčíst, že k výborné eluci kyseliny ferulové ze sorbentu TMAHP došlo celkem **čtyřikrát** (dvakrát byla eluce dostatečná), a to při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 2,0, 5,0 – 2,5, 7,0 – 2,0 a 7,0 – 2,5. I přes

to, že stejná 4 políčka v tabulce č. 14 odpovídají nedostatečnému zachytu kyseliny ferulové na sorbentu.

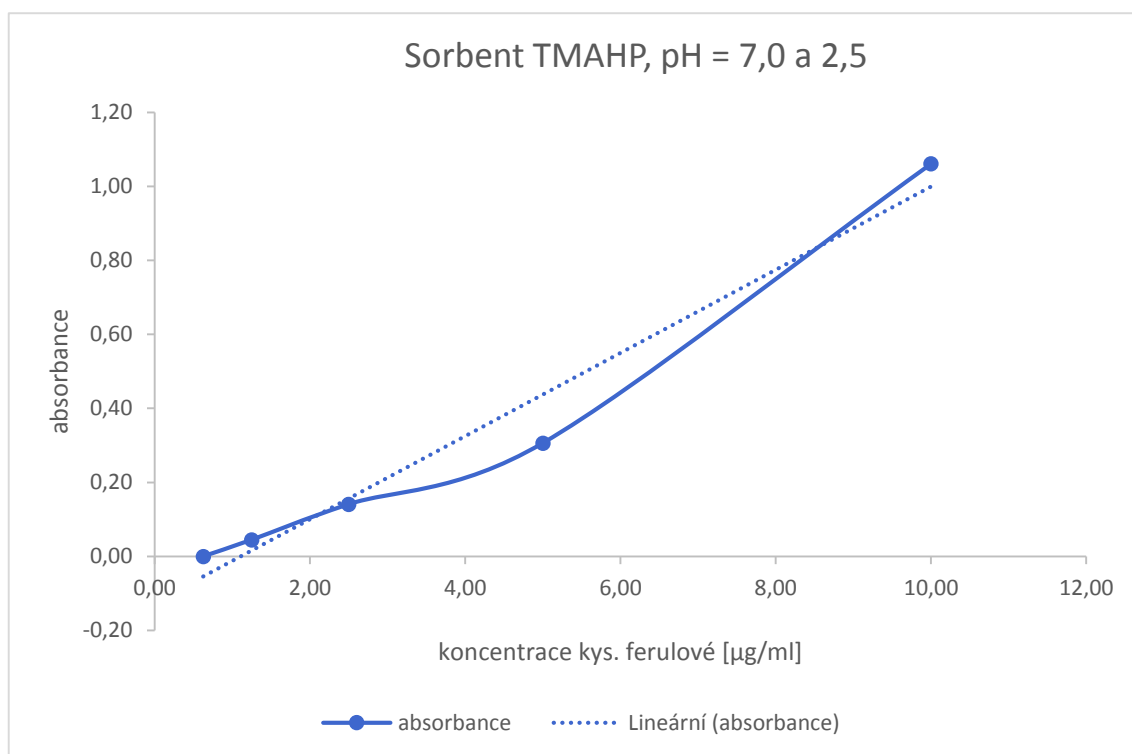
Jednu z těchto čtyř elucí zachycuje obrázek č. 25. Na něm můžeme vidět záznam absorbance kyseliny ferulové (při vlnových délkách 325 a 240 nm) v průběhu jejího dávkování do systému (červená šipka v obrázku) a její eluci (modrá šipka v obrázku), při hodnotě pH promývacího pufru **7,0** a elučního pufru **2,5**. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Jak je patrné, dochází k **výborné** eluci kyseliny ze sorbentu TMAHP (absorbance s hodnotou nad 1,00, píky velmi úzké → eluce rychlá) a zároveň nedostatečnému zachytu vzorku na sorbentu při dávkování (absorbance větší než 0,20).



Obrázek č. 25: Záznam absorbance vzorku v průběhu jeho dávkování do systému a při následné eluci. Sorbent TMAHP, pH promývacího pufru 7,0, pH elučního pufru 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno programem č. 4 (tabulka č. 9), při vlnových délkách 325 a 240 nm a ve třech opakováních.

Graf na obrázku č. 26 znázorňuje změny absorpance při eluci klesajících koncentrací kyseliny ferulové (10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml).



Obrázek č. 26: Graf absorpance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent TMAHP, pH promývacího pufru 7,0, pH elučního pufru 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml.

Nejnižší koncentrace kyseliny ferulové, kterou bylo možno zachytit při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 2,0, 5,0 – 2,5, a 7,0 – 2,5 byla 1,250 µg/ml, a při kombinaci 7,0 – 2,0 0,625 µg/ml.

Výšky píků nebyly ani v jednom případě mimo detekční limit.

RSD signálů tří měření bylo obvykle menší než 10 % a jen výjimečně bylo dosaženo hodnoty 15 %.

Manipulace s tímto sorbentem byla **dobrá**.

Následujícím sorbentem, který byl testován, byl sorbent QAE - A25.

Sorbent: **QAE - A25 – nástřik**

Tabulka č. 16: QAE - A25 – nástřik.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✓	✓	✓	✓
	2,0	✓	✓	—	—
	2,5	—	—	—	✗

LEGENDA:

- ✓ výborný záchyt vzorku na sorbentu
- dostatečný záchyt vzorku na sorbentu
- ✗ nedostatečný záchyt vzorku na sorbentu

Sorbent: **QAE - A25 – eluce**

Tabulka č. 17: QAE - A25 – eluce.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✓	—	✓	✓
	2,0	✓	—	✗	✓
	2,5	—	✗	✗	—

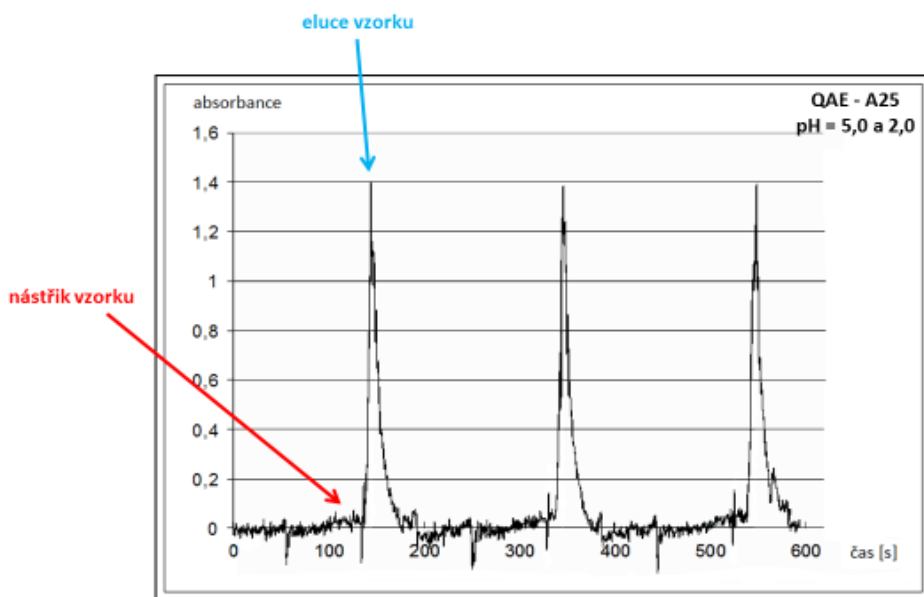
LEGENDA:

- ✓ výborná eluce
- dostatečná eluce
- ✗ nedostatečná eluce

V tabulce č. 17 můžeme vidět, že k výborné eluci kyseliny ferulové ze sorbentu QAE - A25 došlo celkem **pětkrát** (čtyřikrát byla eluce dostatečná), a to při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 1,5, 5,0 – 2,0, 7,0 – 1,5, 8,0 – 1,5 a 8,0 – 2,0. Stejných 5 políček v tabulce č. 16 odpovídá také výbornému záchytu kyseliny ferulové na sorbentu a v jednom případě záchytu dostatečnému.

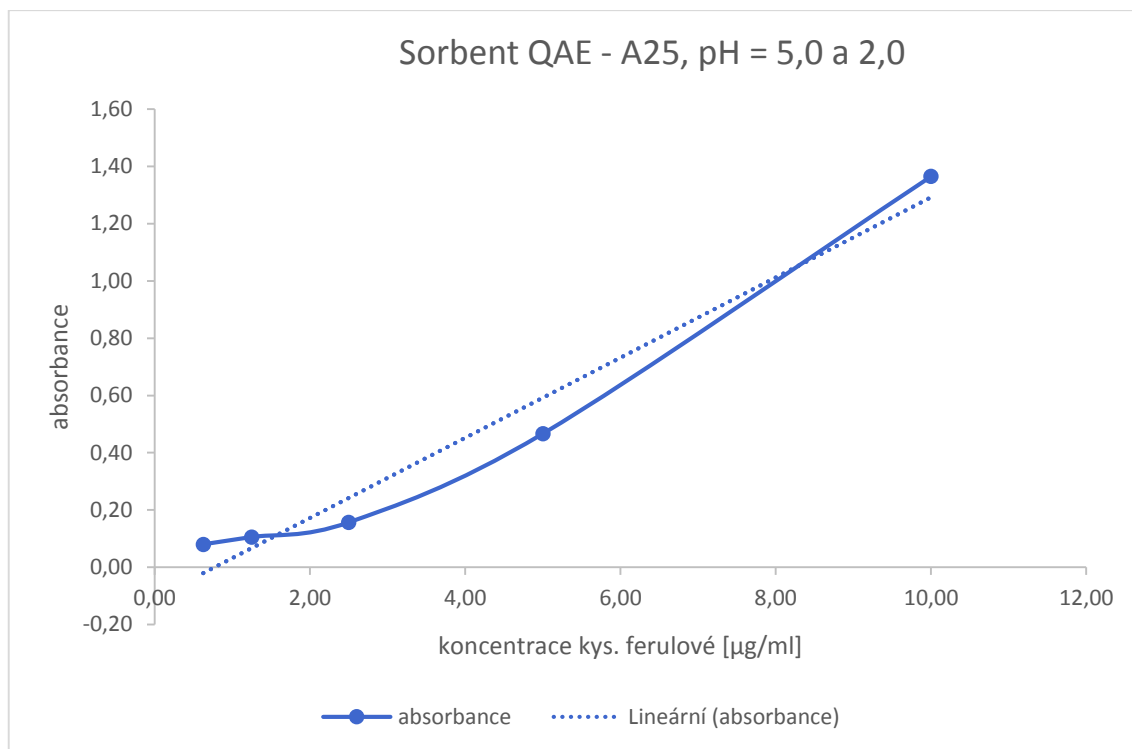
Jedna z těchto pěti elucí je zachycena na obrázku č. 27. Na něm můžeme vidět záznam absorbance kyseliny ferulové (při vlnových délkách 325 a 240 nm) v průběhu jejího dávkování do systému (červená šipka v obrázku) a její eluci (modrá šipka v obrázku), při hodnotě pH promývacího pufru **5,0** a elučního pufru **2,0**. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Jak je patrné, dochází k **výborné** eluci kyseliny ze sorbentu QAE - A25 (absorbance s hodnotou nad 1,00, píky úzké → eluce dostatečně rychlá) a zároveň výbornému záchytu vzorku na sorbentu při dávkování (absorbance menší než 0,11).



Obrázek č. 27: Záznam absorbance vzorku v průběhu jeho dávkování do systému a při následné eluci. Sorbent QAE - A25, pH promývacího pufru 6,0, pH elučního pufru 2,0, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno programem č. 4 (tabulka č. 9), při vlnových délkách 325 a 240 nm a ve třech opakováních.

Graf na obrázku č. 28 znázorňuje změny absorbance při eluci klesajících koncentrací kyseliny ferulové (10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml).



Obrázek č. 28: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent QAE - A25, pH promývacího pufru 5,0, pH elučního pufru 2,0, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml.

Nejnižší koncentrace kyseliny ferulové, kterou bylo možno zachytit při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5 – 1,5, 5 – 2,0, 7 – 1,5, 8 – 1,5 a 8 – 2,0 byla 0,625 µg/ml.

Výšky píků nebyly ani v jednom případě mimo detekční limit.

RSD signálů tří měření bylo obvykle menší než 10 % a jen výjimečně bylo dosaženo hodnoty 15 %.

Manipulace s tímto sorbentem byla **velmi dobrá**.

Dalším sorbentem v pořadí byl sorbent SAX - BOND.

Sorbent: **SAX - BOND – nástřík**

Tabulka č. 18: SAX - BOND – nástřík.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✓	✗	—	✗
	2,0	✓	—	✗	—
	2,5	✓	—	✗	✓

LEGENDA:

- ✓ výborný záchyt vzorku na sorbentu
- dostatečný záchyt vzorku na sorbentu
- ✗ nedostatečný záchyt vzorku na sorbentu

Sorbent: **SAX - BOND – eluce**

Tabulka č. 19: SAX - BOND – eluce.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✓	✓	—	✗
	2,0	✓	—	✓	—
	2,5	—	—	✓	—

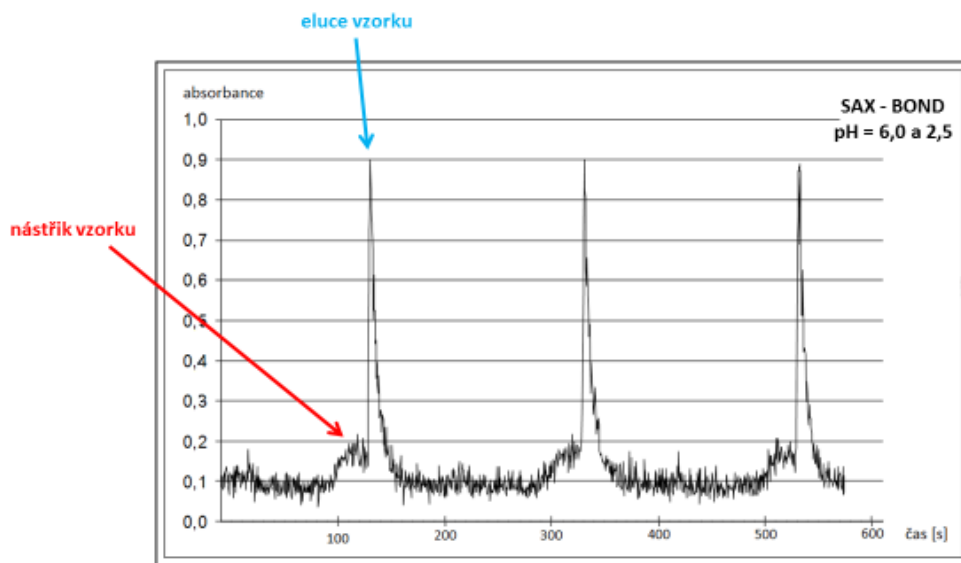
LEGENDA:

- ✓ výborná eluce
- dostatečná eluce
- ✗ nedostatečná eluce

V tabulce č. 19 můžeme vidět, že k výborné eluci kyseliny ferulové ze sorbentu SAX - BOND došlo celkem **pětkrát** (pouze jednou byla eluce nedostatečná), a to při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 1,5, 5,0 – 2,0, 6,0 – 1,5, 7,0 – 2,0 a 7,0 – 2,5. Stejných 5 políček v tabulce č. 18 odpovídá jak výbornému záchytu kyseliny ferulové na sorbentu, tak i záchytu nedostatečnému.

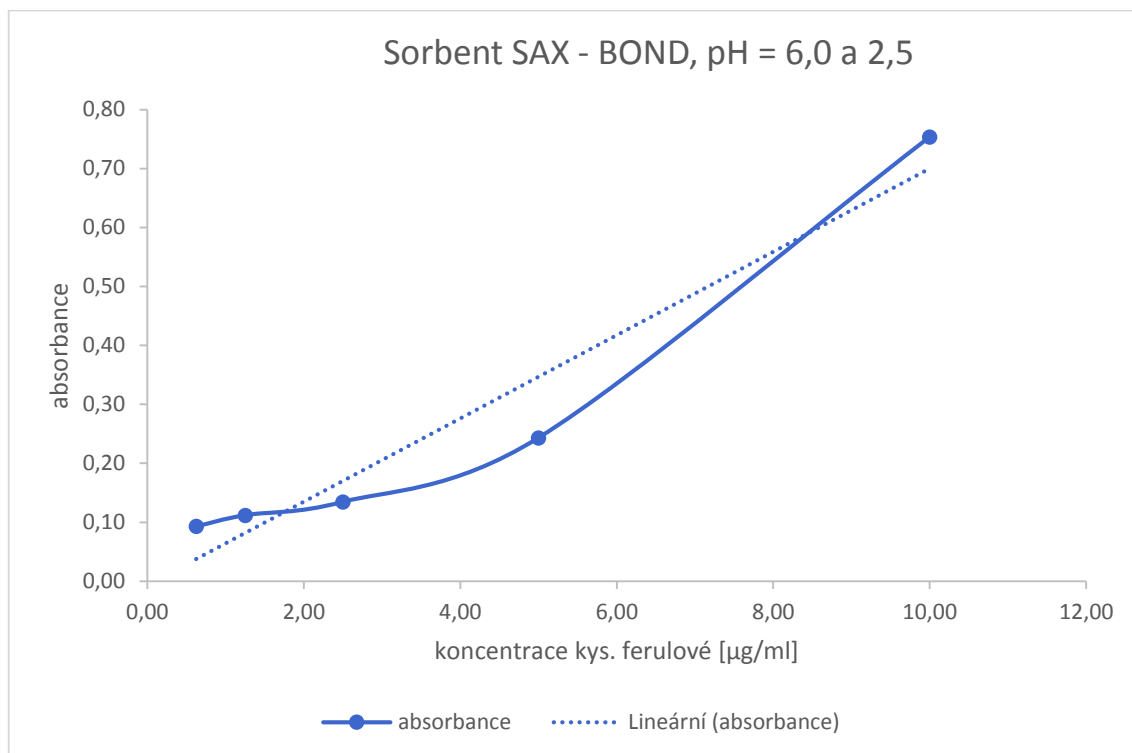
Na obrázku č. 29 můžeme vidět záznam absorbance kyseliny ferulové (při vlnových délkách 325 a 240 nm) v průběhu jejího dávkování do systému (červená šipka v obrázku) a její eluci (modrá šipka v obrázku), při hodnotě pH promývacího pufru **6,0** a elučního pufru **2,5**. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Dochází k **dostatečné** eluci kyseliny ze sorbentu SAX - BOND (absorbance s hodnotou v rozmezí 0,40 – 1,00, píky úzké → eluce dostatečně rychlá) a zároveň dostatečnému záchytu vzorku na sorbentu při dávkování (absorbance v rozmezí hodnot 0,12 – 0,20).



Obrázek č. 29: Záznam absorbance vzorku v průběhu jeho dávkování do systému a při následné eluci. Sorbent SAX - BOND, pH promývacího pufru 6,0, pH elučního pufru 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g/ml}$. Měřeno programem č. 4 (tabulka č. 9), při vlnových délkách 325 a 240 nm a ve třech opakováních.

Graf na obrázku č. 30 znázorňuje změny absorbance při eluci klesajících koncentrací kyseliny ferulové (10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml).



Obrázek č. 30: Graf absorbance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent SAX - BOND, pH promývacího pufru 6, pH elučního pufru 2,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml.

Nejnižší koncentrace kyseliny ferulové, kterou bylo možno zachytit při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 1,5, 6,0 – 1,5, 7,0 – 2,0 a 7,0 – 2,5 byla 0,625 µg/ml a při pH 5,0 – 2,0, 1,250 µg/ml.

Výšky píků byly ve dvou případech mimo detekční limit, a to při koncentraci kys. ferulové 10,000 µg/ml a při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 1,5, a 6,0 – 1,5.

RSD signálů tří měření bylo obvykle menší než 10 % a jen výjimečně bylo dosaženo hodnoty 15 %.

Manipulace s tímto sorbentem byla **velmi dobrá**.

Posledním testovaným sorbentem byl sorbent SAX - DSC.

Sorbent: **SAX - DSC – nástřik**

Tabulka č. 20: SAX - DSC – nástřik.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	✗	✗	✗	✓
	2,0	✗	✗	✗	✓
	2,5	✗	✗	✗	✗

LEGENDA:

✓ výborný záchyt vzorku na sorbentu

✗ nedostatečný záchyt vzorku na sorbentu

Sorbent: **SAX - DSC – eluce**

Tabulka č. 21: SAX - DSC – eluce.

		promývací pufr			
		pH	5,0	6,0	7,0
eluční pufr	1,5	—	✗	✓	—
	2,0	—	✗	—	—
	2,5	✓	✗	✗	—

LEGENDA:

✓ výborná eluce

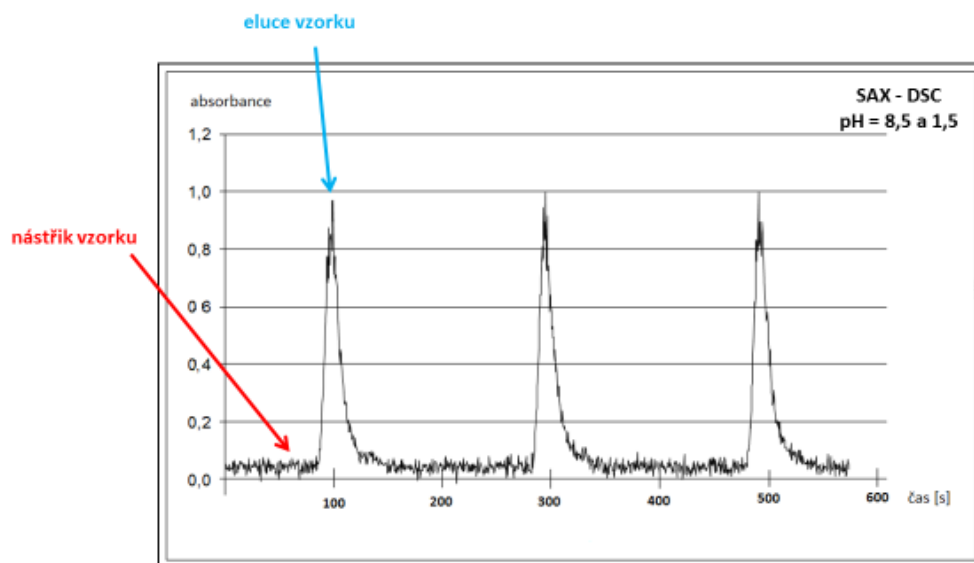
— dostatečná eluce

✗ nedostatečná eluce

V tabulce č. 21 můžeme vidět, že k výborné eluci kyseliny ferulové ze sorbentu SAX - DSC došlo celkem **dvakrát** (šestkrát byla eluce dostatečná), a to při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 2,5 a 7,0 – 1,5. Stejná 2 políčka v tabulce č. 20 odpovídají nedostatečnému záchytu kyseliny ferulové na sorbentu.

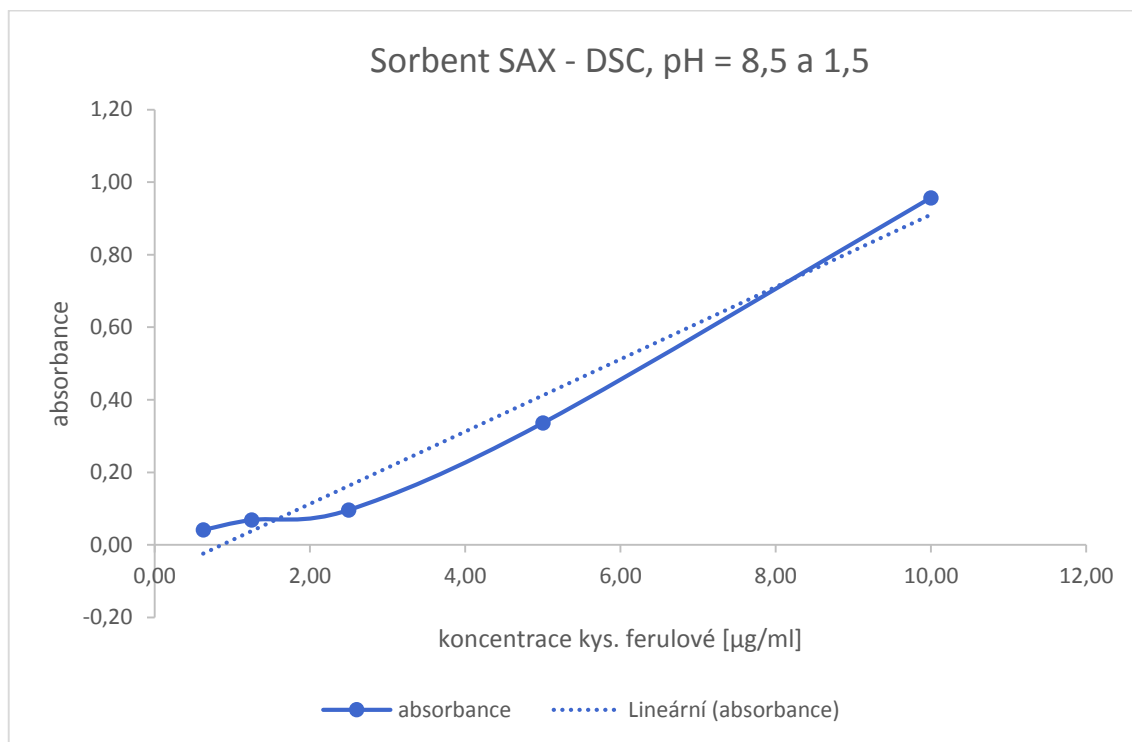
Na obrázku č. 31 můžeme vidět záznam absorbance kyseliny ferulové (při vlnových délkách 325 a 240 nm) v průběhu jejího dávkování do systému (červená šipka v obrázku) a její eluci (modrá šipka v obrázku), při hodnotě pH promývacího pufru **8,5** a elučního pufru **1,5**. Měření bylo provedeno ve třech opakováních.

Dochází k **dostatečné** eluci kyseliny ze sorbentu SAX - DSC (absorbance s hodnotou v rozmezí 0,40 – 1,00, píky širší → eluce pomalejší) a zároveň výbornému záchytu vzorku na sorbentu při dávkování (absorbance menší než 0,11).



Obrázek č. 31: Záznam absorbance vzorku v průběhu jeho dávkování do systému a při následné eluci. Sorbent SAX - DSC, pH promývacího pufru 8,5, pH elučního pufru 1,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Měřeno programem č. 4 (tabulka č. 9), při vlnových délkách 325 a 240 nm a ve třech opakováních.

Graf na obrázku č. 32 znázorňuje změny absorpance při eluci klesajících koncentrací kyseliny ferulové (10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml).



Obrázek č. 32: Graf absorpance při eluci klesajících koncentrací vzorku a lineární spojnice trendu. Sorbent SAX - DSC, pH promývacího pufru 8,5, pH elučního pufru 1,5, koncentrace kyseliny ferulové 10,000 → 5,000 → 2,500 → 1,250 → 0,625 µg/ml.

Nejnižší koncentrace kyseliny ferulové, kterou bylo možno zachytit při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 5,0 – 2,5 a 7,0 – 1,5 byla 0,625 µg/ml.

Výšky píků byly v jednom případě mimo detekční limit, a to při koncentraci kys. ferulové 10,000 µg/ml a při kombinaci hodnot pH promývacího a elučního pufru 7,0 – 1,5.

RSD signálů tří měření bylo obvykle menší než 10 % a jen výjimečně bylo dosaženo hodnoty 15 %.

Manipulace s tímto sorbentem byla **nedostatečná**, sorbent vytvářel shluky uvnitř průtokové cely a po skončeném měření se dostával ze systému obtížně ven.

5.2 CELKOVÉ SHRNU TÍ VLASTNOSTÍ SORBENTŮ

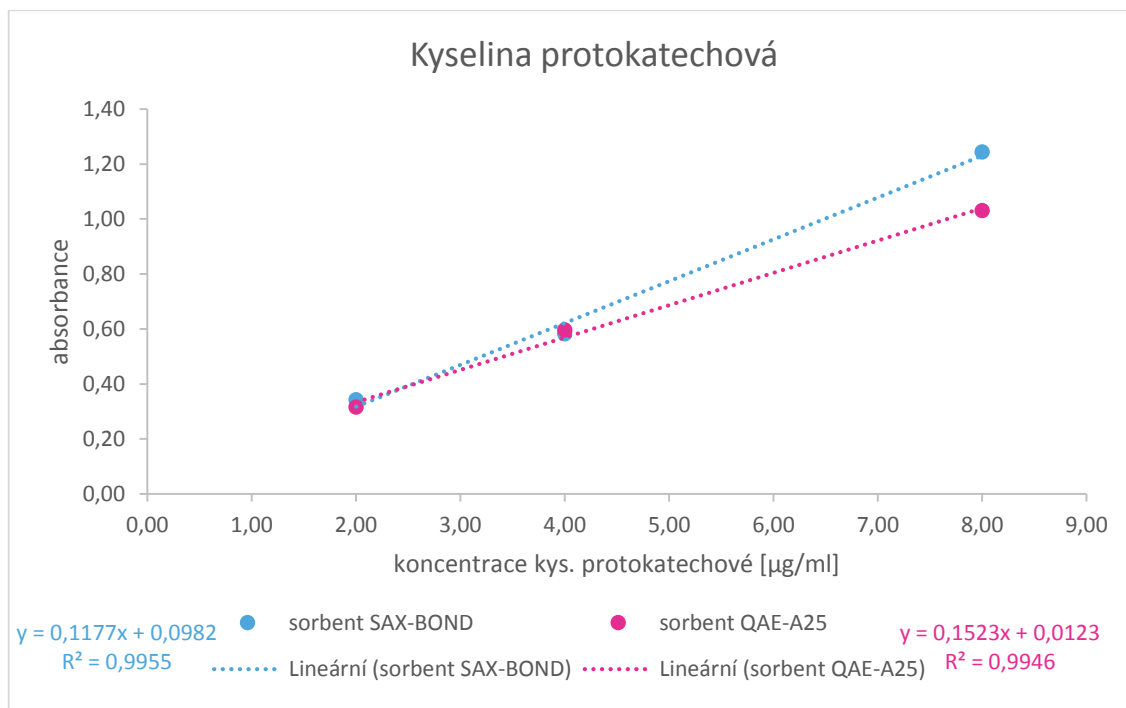
Jako sorbenty, se kterými bude provedeno další měření, byly zvoleny sorbenty QAE - A25 a SAX - BOND. Důvodem byla lepší eluce vzorku oproti zbylým dvěma sorbentům a snazší manipulace.

Jako nejvhodnější podmínky pro další měření byla zvolena hodnota pH promývacího pufru 5,0 a elučního pufru 1,5.

5.3 KALIBRACE S KYSELINOU PROTOKATECHOVOU A *O*-KUMAROVOU

Kyseliny protokatechová a *o*-kumarová byly analyzovány na dvou vybraných sorbentech (QAE - A25 a SAX - BOND) a za vybraných podmínek (pH promývacího pufru 5,0 a pH elučního pufru 1,5).

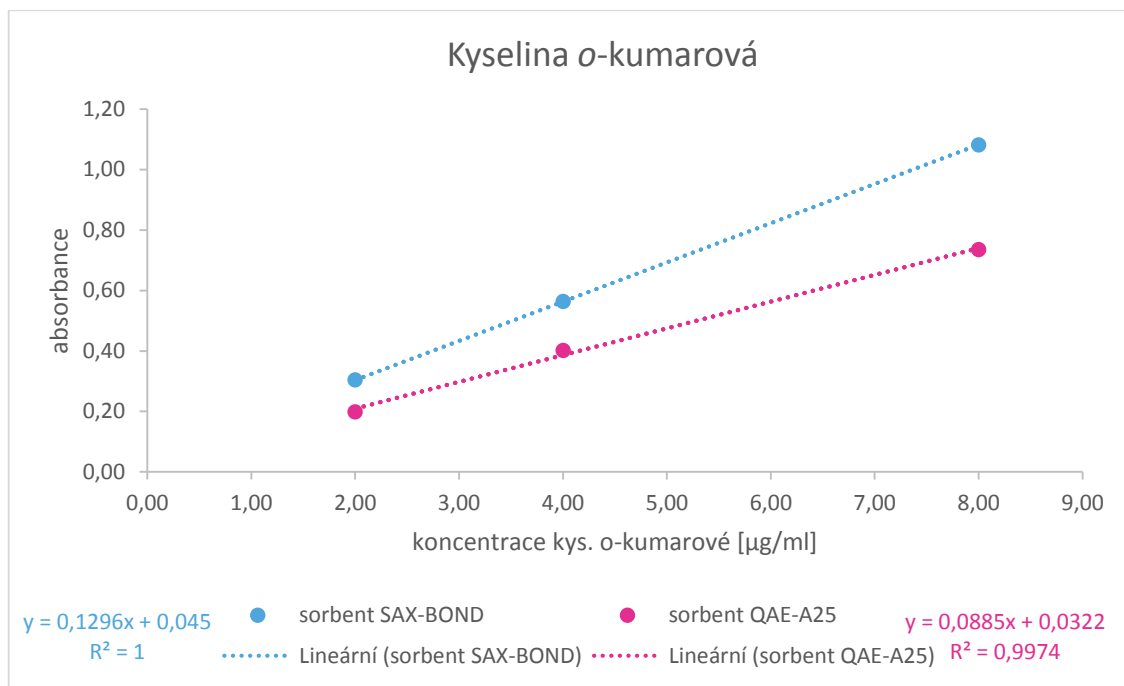
Na obrázku č. 33 můžeme vidět kalibrační křivku kyseliny protokatechové na obou těchto sorbentech. Kyselina protokatechová má horší záchyt na sorbentu SAX - BOND (to z tohoto grafu patrné není, vyplývá to z výsledků měření), ale eluuje se z něj velmi dobře, lépe než ze sorbentu QAE - A25.



Obrázek č. 33: Eluce kyseliny protokatechové ze sorbentu SAX - BOND a QAE - A25. pH promývacího pufru 5,0, pH elučního pufru 1,5.

Na obrázku č. 34 je kalibrační křivka kyseliny *o*-kumarové na sorbentu QAE - A25 a SAX - BOND, za zvolených podmínek (pH promývacího pufru 5,0 a pH elučního pufru 1,5).

Jak je vidět, kyselina *o*-kumarová má lepší eluci ze sorbentu SAX - BOND (a opět má na tomto sorbentu horší záchyt).



Obrázek č. 34: Eluce kyseliny o-kumarové ze sorbentu SAX - BOND a QAE - A25. pH promývacího pufu 5,0, pH elučního pufu 1,5.

Z obou grafů je patrné, že efektivní extrakce obou kyselin probíhá na obou vybraných sorbentech, ale zatím co u SAX - BOND jsou výsledky podobné, u QAE - A25 poměrně rozdílné. Pro extrakci vzorku s více fenolickými kyselinami se jeví SAX - BOND jako vhodnější, protože se zdá být více univerzální pro různé fenolické kyseliny.

Tabulka č. 22: Směrnice přímk eluce kyseliny ferulové, protokatechové a o-kumarové na sorbentech SAX - BOND a QAE - A25.

SMĚRNICE PŘÍMKY			
kyselina	sorbent	SMĚRNICE PŘÍMKY	
		SAX - BOND	QAE - A25
ferulová		0,1088	0,0586
protokatechová		0,1177	0,1523
o-kumarová		0,1296	0,0885

6 Diskuze

Jak je z výsledkové části patrné, má použitý sorbent na průběh extrakce zásadní vliv. I přes to, že všechny čtyři sorbenty použité při měření byly silné aniontové měniče (SAX) s funkční skupinou – kvarterní amoniovou solí, výsledky jednotlivých analýz se mezi sebou poměrně dost liší. Vliv měl jak materiál částic, tak i funkční skupina.

Významný krok, který má značný vliv na extrakci, je tvorba kolonky uvnitř ventilu. Každá nově vytvořená kolonka je jiná. Aby byla suspenze částic přístrojem nasáta, musí se ručně protřepávat, proto může být obtížné připravit kolonku vždy o stejné výšce. Někdy se musí kolonka připravovat opakovaně, aby její sloupec dosahoval požadované výšky.

Může také docházet ke shlukování částic sorbentu a ke změnám stability kolonky během jednotlivých kroků extrakce.

V naměřených datech je patrná nelinearita odezvy (znázorněna na obrázcích č. 26, 28, 30 a 32). Může být způsobena i ne zcela optimálním vyhodnocováním dat – hodnoceny byly pouze výšky píků (jejich ruční odečítání v nízkých koncentracích je nepřesné díky šumu) a ne jejich plocha, která by dávala přesnější informace pro srovnání mezi různými podmínkami měření.

V několika měřeních přesahovala výška píku horní limit detektoru (především u sorbentu SAX – BOND). Sice v těchto případech neznáme přesnou výšku píku, ale i tak tento fakt hodnotíme pozitivně, protože značí, že eluce proběhla velmi rychle a kompletně.

Každé měření bylo provedeno ve třech opakováních a z těchto tří hodnot byla vypočítána relativní směrodatná odchylka (RSD), která se pohybovala v rozmezí 5 – 10 %, jen výjimečně dosahovala k 15 %. Tato skutečnost ukazuje na dobrou funkčnost a stabilitu systému.

7 Závěr

V této práci byly navzájem srovnávány čtyři různé aniontově výměnné sorbenty (TMAHP, QAE - A25, SAX - BOND a SAX - DSC) s cílem zjistit, který bude vhodný pro následnou podrobnější analýzu směsných vzorků fenolických kyselin.

Hlavní testovanou fenolickou sloučeninou byla kyselina ferulová, která byla odzkoušena na každém ze čtyřech sorbentů v pěti různých koncentracích (10,000 µg/ml, 5,000 µg/ml, 2,500 µg/ml, 1,250 µg/ml a 0,625 µg/ml) a byla sledována její absorbance při vlnových délkách 325 a 240 nm.

Nástřik testovaných pěti koncentrací kyseliny ferulové a jejich následná eluce probíhala na všech čtyřech sorbentech při čtyřech různých pH (5,0, 6,0, 7,0 a 8,5) promývacího pufru a třech různých pH (1,5, 2,0 a 2,5) pufru elučního. U každého sorbentu byly vyhodnoceny nejlepší podmínky pro nástřik a eluci kyseliny ferulové.

Dále byla hodnocena manipulace s jednotlivými sorbenty, především praktická stránka jejich použití ve formátu LOV (laboratoř na ventilu). Sorbent SAX - DSC se pro toto použití ukázal jako nevhodný, jelikož docházelo k jeho shlukování uvnitř průtokové cely a bylo velmi obtížné jej po skončeném měření z přístroje odstranit. S ostatními třemi sorbenty byla manipulace dobrá, popř. velmi dobrá.

Po celkovém zhodnocení všech čtyřech sorbentů při různých podmínkách měření byly určeny jako nejlepší sorbenty SAX - BOND a QAE - A25 a jako nejlepší podmínky pro další analýzu pH promývacího pufru 5,0 a pH elučního pufru 1,5.

Tyto zvolené sorbenty a podmínky analýzy byly následně použity při měření dalších fenolických kyselin, a to kyseliny protokatechové a kyseliny *o*-kumarové. I v tomto případě byla potvrzena dobrá funkčnost zvolených sorbentů a měřících podmínek. Pro analýzu kyseliny protokatechové se ukázal jako vhodnější sorbent SAX - BOND, stejně jako pro kyselinu *o*-kumarovou.

Tento primární screening sorbentů a měřících podmínek byl prvním krokem pro obsáhlejší analýzu dalších fenolických kyselin a jejich směsných vzorků, které bychom se chtěli věnovat v budoucí rigorózní práci.

8 Zdroje

[1] MARCANÍKOVÁ K., BEŇOVÁ B. *Využití coulometrického detektoru pro analýzu fenolických látek*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_s1_s27-s30.pdf>.

[2] CVIKROVÁ M. *Stanovení obsahů volných a vázaných fenolických kyselin v půdě a v rostlinném materiálu (kořeny, listy, jehlice) dřevin rostoucích v zájmové lokalitě Fláje a v kontrolních podmínkách (nádobové pokusy a hydroponie)*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.ochranavody.cz/upload/out/Stanoveni%20obsahu%20volnych%20a%20vazanych%20fenolickych%20kyselin%20CZ%20WWW.pdf>>.

[3] HONEGR J., POSPÍŠILOVÁ M. *Determination of phenolic acids in plant extracts using CZE with on-line transient isotachophoretic preconcentration*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <https://www.researchgate.net/publication/235524024_Determination_of_phenolic_acids_in_plant_extracts_using_CZE_with_on-line_transient_isotachophoretic_preconcentration>.

[4] FARMACEUTICKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V HRADCI KRÁLOVÉ *Daidalea – Sekundární metabolity*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <http://apps.faf.cuni.cz/daidalea/docs/Compound/2-1-1_Fenoly_fenolicke_kyseliny.pdf>.

[5] KOLEV S. D., MCKELVIE I. D. *Advances in flowinjection analysis and related techniques*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=d0xi1huf3QMC&printsec=frontcover&dq=Advances+in+flow+injection+analysis+and+related+techniques&hl=cs&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=Advances%20in%20flow%20injection%20analysis%20and%20related%20techniques&f=false>.

[6] VALCÁRCEL M., LUQUE DE CASTRO M. D. *Automatic Methods of Analysis*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<https://books.google.cz/books?id=YrDoavqnRpEC&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>>.

- [7] RŮŽIČKA J. *Flow Injection Analysis*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.flowinjectiontutorial.com/>>.
- [8] PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
Průtoková injekční analýza se spektrofotometrickou detekcí. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<https://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/fia.pdf>>.
- [9] CHOCHOLOUŠ P. *Automatizace analytických postupů s využitím průtokových metod SIA a FIA*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné ze studijních materiálů Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, katedry analytické chemie.
- [10] FIALAB *FlowInjection*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.flowinjection.com/>>.
- [11] PASEKOVÁ H., POLÁŠEK M., SOLICH P. *Sekvenční injekční analýza*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_354-359.pdf>.
- [12] VIDIGAL S., TÓTH I., RANGEL A. *Exploiting the bead injection LOV approach to carry out spectrophotometric assays in wine: Application to the determination of iron*. *Talanta*, 2011, vol. 84, no. 5, s. 1298-1303.
- [13] ŠATÍNSKÝ D., SOLICH P., CHOCHOLOUŠ P., KARLÍČEK R. *Monolithic columns – a new concept of separation in the sequention technique*. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 499, no. 1-2, s. 205-214.
- [14] CHOCHOLOUŠ P., SOLICH P., ŠATÍNSKÝ D. *An overview of Sequential Injection Chromatography*. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 600, no. 1-2, s. 129-135.
- [15] CHOCHOLOUŠ P., KOSAŘOVÁ L., ŠATÍNSKÝ D., SKLENÁŘOVÁ H., SOLICH P. *Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column*. *Talanta*, 2011, vol. 85, no. 2, s. 1129-1134.
- [16] CHOCHOLOUŠ P., ŠATÍNSKÝ D., SLADKOVSKÝ R., POSPÍŠILOVÁ M., SOLICH P. *Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection Chromatography using miniaturized monolithic column*. *Talanta*, 2008, vol. 77, no. 2, s. 566-570.

- [17] KLOUDA P. *Moderní analytické metody*. 2. aktualizované vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [18] AGILENT *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf>.
- [19] WATERS *SPE Method Development*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <http://www.waters.com/waters/en_US/SPE-Method-Development/nav.htm?cid=10083845>.
- [20] FTP.MN *Sample preparation (AccuBOND[III] SAX)*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/Catalog-en/KATEN200001-2Sampleprep-www.pdf>.
- [21] SIGMA-ALDRICH *Guide to Solid Phase Extraction*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>.
- [22] SIGMA-ALDRICH *Ionexchange Methodology*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
<<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/ionexchange-methodology.html>>.
- [23] SIGMA-ALDRICH *QAE Sephadex A25 chloride form*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/q25120?lang=en®ion=CZ&gclid=COu3rpWohMsCFdYy0wodBX8NQQ>>.
- [24] GE HEALTHCARE LIFE SCIENCES *QAE Sephadex A25* [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-cz/products/AlternativeProductStructure_17463/17019001>.
- [25] SIGMA-ALDRICH *Discovery DSC-SAX SPE products*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9644104>>.
- [26] SUPELCO *Solid Phase Extraction. Discovery Products*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.supelco.com.tw/C-2%20%20150-163%20New.pdf>>.

[27] AGILENT *Agilent Technologies AccuBOND[II] Sorbents for SPE Chromatography – SAX*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.berktree.com/agilent-accubond-ii-sorbents-for-spe-chromatography-sax-model-189-1602-each.html>>.

[28] IONTOSORB *Iontosorb TMAHP 100*. [online] [cit. únor 2016]. Dostupné z: <<http://www.iontosorb.cz/pages/iec/iontos03.htm>>.