

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



Purifikace biokonjugátů azaftalocyaninů pomocí SPE

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Radim Kučera, Ph.D.

Hradec Králové 2012

Jakub Cichý

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně a všechna literatura a použité zdroje, z kterých jsem při zpracování této práce čerpal, jsou uvedeny v seznamu literatury a v práci řádně ocitovány.“

V Hradci Králové, dne 1. 5. 2012.

.....

podpis

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli PharmDr. Radimu Kučerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, rady a zapůjčení odborné literatury při vypracování mé diplomové práce. Dále chci poděkovat své rodině za podporu při tvorbě této práce.

Tato diplomová práce byla vypracována za podpory projektu SVV – 265 001.

ABSTRAKT

Diplomová práce

Purifikace biokonjugátů azaftalocyaninů pomocí SPE

Jakub Cichý

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra Farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Tato práce se zabývá vývojem metody pro čištění biokonjugátů azaftalocyaninů pomocí extrakce tuhou fází (SPE). Tyto deriváty azaftalocyaninů jsou zkoumány jako molekulární sondy zhášející fluorescenci v různých genetických analýzách.

Postupně byly uskutečněny experimenty s cílem najít ideální SPE podmínky pro tento analyt. Zkoušeli jsme různé druhy SPE kolonek a jejich vliv na extrakci. Následně byly optimalizovány jednotlivé kroky extrakce, provedeny změny pH, molarity a síly elučních roztoků se snahou získat co nejlepší separační výsledky. Jako nejlepší se jevila kolona DSC-Ph (500 mg/3 ml) a neoptimálnější podmínky byly:

- Kondicionace: 3 ml 100% MeOH + 5 ml 50mM TEAA
- Nanesení vzorku: 100 µl 100nM
- Promývací roztok: 9 ml 55% MeOH/50mM TEAA
- Eluční roztok: 3 ml 80% MeOH/50mM TEAA

Touto metodou jsme získali výtěžnost extrakce analytu okolo 70-75 %, s relativním 10% znečištěním zbytky oligonukleotidových řetězců ve finálním eluátu.

Tato SPE metoda je určitou alternativou k již vyvinuté HPLC metodě pro čištění biokonjugátů azaftalocyaninů.

Klíčová slova: *Biokonjugáty azaftalocyaninů, SPE, příprava vzorků, HPLC.*

ABSTRAKT

Diploma thesis

The purification of bioconjugates of azaphthalocyanines by SPE

Jakub Cichý

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové,

Department of Pharmaceutical chemistry and drug analysis

This thesis occupies the development of a method for purification of bioconjugates of azaphthalocyanines by solid-phase extraction (SPE). These derivatives of azaphthalocyanine are investigated as molecular probes to quench of fluorescence in various genetic analysis.

Experiments were carried out successfully in order to find the ideal SPE conditions for the analyte. We tried also different types of SPE columns and their influence on the extraction. Subsequently, each extraction step was optimized, the changes in pH, molarity and strength of elution solutions were made with an effort to get the best separation results. The best column appeared to be DSC-Ph (500 mg/3 ml) and the most optimal conditions were:

- Condition: 3 ml 100% MeOH + 5 ml 50mM TEAA
- Apply sample: 100 µl 100nM
- Washing solution: 9 ml 55% MeOH/50mM TEAA
- Elution solution: 3 ml 80% MeOH/50mM TEAA

We obtained by this method a recovery of extraction analyte around 70-75 %, with 10% relative contamination of remains of oligonucleotide chains in the final eluate solution.

The SPE method is an alternative to the already developed HPLC method for purification of bioconjugates of azaphthalocyanines.

Keywords: *Bioconjugates of azaphthalocyanines, SPE, sample preparation, HPLC.*

Použité zkratky

Å	-	Ångström
Da	-	Dalton
ACN	-	Acetonitril
AzaPc	-	Alkylaminoderiváty azaftalocyaninů bez navázaného oligonukleotidového řetězce
Bio-AzaPc	-	Alkylaminoderiváty azaftalocyaniny s navázaným oligonukleotidovým řetězcem (biokonjugáty AzaPc)
G6	-	Bio-AzaPc s navázaným delším oligonukleotidovým řetězcem
HPLC	-	High-performance liquid chromatography
J6	-	Bio-AzaPc s navázaným kratším oligonukleotidovým řetězcem
MeOH	-	Methanol
MEPS	-	Microextraction by packed sorbent
MIPs	-	Molecularly imprinted polymers
MSE	-	Monolith spin extraction
MSPD	-	Matrix solid-phase dispersion
OGN	-	Volné oligonukleotidové řetězce
OPC	-	Oligonucleotide Purification Cartridge
PAGE	-	Polyacrylamide Gel Purification
Pc	-	Ftalocyaniny
PCB	-	Polychlorované bifenyly
PDMS	-	Polydimethylsiloxan
PDT	-	Fotodynamická terapie
RAM	-	Restricted access materials
RPC	-	Reverse Phase Cartridge
SBSE	-	Stir bar sorptive extraction
SDB	-	Styren-divinylbenzen
SPE	-	Solid-phase extraction
SPME	-	Solid-phase microextraction
TEAA	-	Triethylamonium acetát
TFC	-	Turbulent-flow chromatography
THF	-	Tetrahydrofuran

Obsah

1. Úvod	3
2. Teoretická část	4
2.1. Azaftalocyaniny	4
2.1.1. AzaPc jako zhasěče fluorescence	4
2.1.2. Čištění AzaPc	5
2.2. Extrakce na pevné fázi – SPE	6
2.2.1. Mobilní a stacionární fáze	7
2.2.2. Jednotlivé kroky SPE extrakce	7
2.2.3. Rozdělení SPE na základě převládající interakce	8
2.2.3.1. Extrakce na reverzní fázi	8
2.2.3.2. Normální fáze SPE	9
2.2.3.3. Iontově výměnná fáze SPE (Iontoměnič)	10
2.2.4. Druhy SPE kolonek a sorbentů	11
2.2.4.1. Vlastnosti SPE sorbentů a kolonek	12
2.2.4.2. Výběr vhodného sorbentu	14
2.2.4.3. Silikagelový sorbent	14
2.2.4.4. Stacionární fáze z oxidu hlinitého	17
2.2.4.5. Sorbent složený z hořečnatého silikagelu - Florisil	17
2.2.4.6. Grafitizovaný neporézní sorbent	18
2.2.4.7. Pryskyřičné polymerní sorbenty	18
2.2.4.8. Ostatní typy sorbentů a nové trendy v SPE sorbentech	19
2.3. Další metody přípravy vzorků tuhou fází	23
2.3.1. Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)	23
2.3.2. Mikroextrakce pomocí zabalených sorbentů (MEPS)	24
2.3.3. Stir bar sorptive Extraction (SBSE)	25
2.3.4. Monolith spin extraction (MSE)	26
2.3.5. Turbulent-flow chromatography (TFC)	26
2.2.6. Matrix solid-phase dispersion (MSPD)	26
2.4. HPLC	28
3. Cíl práce	29
4. Praktická část	30
4.1. Chromatografický materiál, chemikálie, přístroje	30
4.1.1. Laboratorní pomůcky	30

4.1.2. SPE - Extrakce tuhou fází	31
4.1.3. Kapalinový chromatografický systém	34
5. Výsledky a diskuze	36
6. Závěr	55
Použitá literatura	57

1. Úvod

Tato diplomová práce se zabývá využitím SPE (Solid-Phase Extraction) metody pro jednoduchou a rychlou separaci biokonjugátů azaftalocyaninů. Azaftalocyaniny jsou poměrně novou skupinou látek odvozených od ftalocyaninu (Pc) [1].

Azaftalocyaniny jako deriváty ftalocyaninů mají do budoucna několik směrů pro svá využití. Tato skupina látek byla původně vyvíjena jako fotosensitizerý ve fotodynamické terapii (PDT). Při zkoumání vztahů mezi strukturou a účinkem se objevily látky naprosto nevhodné pro PDT, ale naopak s vlastnostmi ideálními pro použití jako zhášedce fluorescence [1]. Proto jsou tyto látky i nadále intenzivně studovány na katedře Farmaceutické chemie Farmaceutické fakulty UK v Hradci Králové.

V teoretické části práce jsou uvedeny základní aspekty zkoumaných biokonjugátů azaftalocyaninů a použité SPE metody pro jejich purifikaci. Uvedeny jsou také jiné druhy extrakce tuhou fází. Dále je popsána druhová pestrost v nabídce kolon pro extrakce tuhou fází a příklady nových trendů v SPE kolonkách.

V praktické části byly optimalizovány extrakční parametry pro SPE biokonjugáty azaftalocyaninů (Bio-AzaPc). Byl sledován vliv promývacích a elučních roztoků na výtěžnost a reprodukovatelnost metody.

2. Teoretická část

2.1. Azaftalocyaniny

Ftalocyaniny (Pc) díky svým zajímavým vlastnostem nacházejí uplatnění nejen mezi barvivy, ale také v medicíně, elektrochemii a katalýze. Azaftalocyaniny (AzaPc) patří mezi dusíkaté analogy Pc, kde některé CH skupiny v makrocyclickém systému jsou isosterně nahrazeny dusíky. Právě přítomností dusíkových atomů se mění výrazně jak reaktivita, tak i některé fotochemické a fotofyzikální vlastnosti AzaPc makrocycklů v porovnání s Pc. Produkce singletového kyslíku je hlavní medicínskou aplikací pro tzv. fotodynamickou terapii (PDT). Tvorba singletového kyslíku po ozáření fotosensitizerem je hlavní příčinou, která ničí nádorové buňky. Různé periferní substituce derivátů AzaPc pak určují velikost tvorby singletového kyslíku. Vhodné jsou substituce na alkylsulfanylderiváty a jejich následná centrální chelatace zinečnatým kationtem [1, 2]. Dalším směrem využití těchto látek je uplatnění jako zhášedce fluorescence. Alkylaminoderiváty AzaPc na rozdíl od jiných ftalocyaninů a jiných derivátů AzaPc nevykazují žádnou fluorescenci a mají téměř nulovou produkci singletového kyslíku, díky čemuž mají téměř ideální vlastnosti zhášedců fluorescence [3].

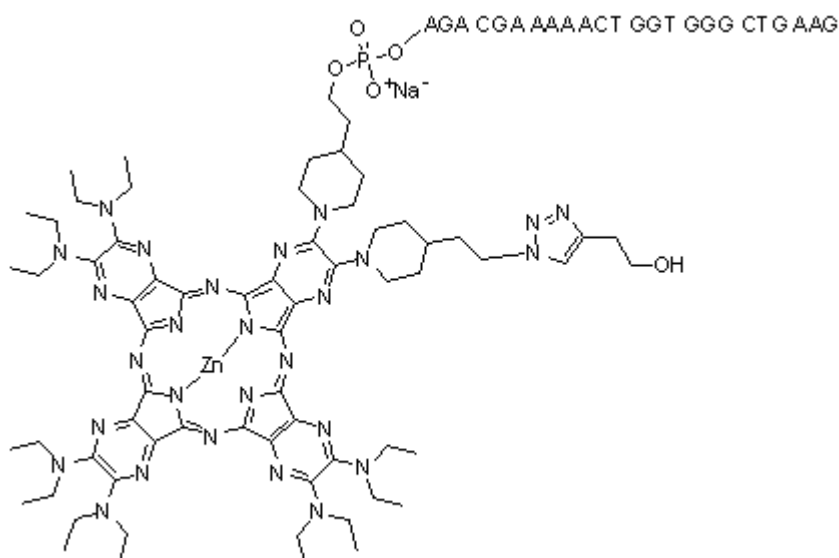
2.1.1. *AzaPc jako zhášedce fluorescence*

Jako jedna z možností detekce a kvantifikace DNA a RNA sekvencí se využívá metoda interakce dvou barviv. Přičemž jedna sloučenina je silným fluoroforem a druhá zhášedcem fluorescence. V dnešní době existuje široká paleta fluorescenčních barviv, avšak jejich zhášedců je naopak nedostatek. Navíc u fluoroforů emitujících při velmi vysokých vlnových délkách (přes 700 nm), prakticky zhášedce chybí. Jelikož právě alkylaminoderiváty AzaPc mají nulovou fluorescenci a produkci singletového kyslíku, jsou tedy ideální jako zhášedce fluorescence. [3].

Po navázání na oligonukleotidové řetězce je lze využít jako molekulární sondy pro různé genetické testy [4]. U jednotlivých Bio-AzaPc byly zkoumány jejich vlastnosti, které byly srovnatelné s dnes běžně používanými zhášedci (např. Black Hole Quencher-2®). Jejich hlavní výhodou oproti dnešním klasickým zhášedcům je vysoká stabilita a díky jejich strukturním modifikacím pokrytí celého spektra fluoroforů [3, 5].

2.1.2. Čištění AzaPc

Purifikací azaftalocyaninů je myšleno oddělení vzorku azaftalocyaninů Q-21 s jednovazebně navázaných oligonukleotidových řetězců na 3' konci (dále jen Bio-AzaPc) od volných oligonukleotidových řetězců (dále jen OGN) a popřípadě od azaftalocyaninů s nenavázanými oligonukleotidy (dále jen AzaPc). Vzorec Bio-AzaPc je znázorněn na obrázku č. 1.



Obrázek č. 2: Vzorec Bio-AzaPc – Q21 [4]

Jako standard v čištění oligonucleotidových řetězců se již léta používá metoda PAGE (Polyacrylamide Gel Purification). Pro čištění oligonukleotidových bází existuje metoda extrakce pomocí RPC (Reverse Phase Cartridge) za použití fenylové kolony, která je naprosto srovnatelná, ne-li lepší než čištění pomocí jiné tradiční kolony OPC (Oligonucleotide Purification Cartridge) [6]. Jedním z důvodů, vedle rychlejšího přečištění většího množství vzorku pomocí RPC, je nižší cena. Navíc RPC lze oproti OPC použít i na čištění vzorků s oligonukleotidovým řetězcem delším než 60 bází [7, 8].

Separaci našeho vzorku (Bio-AzaPc Q-21) lze provést i pomocí HPLC použitím semipreparativní kolony [9], avšak pro zjednodušení a zrychlení celého procesu hodláme v této práci použít kolony pro extrakce tuhou fází.

2.2. Extrakce na pevné fázi – SPE

Název je z anglického solid-phase extraction – zkráceně SPE. SPE je jednoznačně vedoucí metodou v přípravě vzorku, užívanou v rutinních bioanalýzách. Jde o chromatografickou metodu založenou na jednoduchém principu (vytvoření rovnováhy mezi tuhou a kapalnou fází) [10]. Pomocí této separační metody jsou od sebe oddělovány sloučeniny na základě jejich fyzikálních a chemických vlastností [11, 12].

Základním kamenem tohoto procesu jsou dvě fáze, mezi které se rozdělují molekuly vzorku, známé jako mobilní a statická/stacionární fáze. Toto dělení je založeno na rozdílné distribuci zkoumané směsi do obou fází [10, 13].

Metoda se využívá při práci s analyty se středně těkavými a netěkavými vlastnostmi, k zakoncentrování vzorků a přečistění analytů od balastních látek pro jejich další zpracování v analýzách, tzn. k předpřípravě různých vzorků. Slouží především k získání vzorku o vyšší čistotě (oddělení vzorku od balastní matrice). Navíc lze metodu snadno propojit s dalšími chromatografickými procesy. Dnešní vývoj SPE metody a přístrojů umožňuje provádět i více pokusů najednou nebo celý proces automatizovat. Jedna z nejdůležitějších výhod oproti jiným kapalinovým extrakcím, je snížení spotřeby organických rozpouštědel a tím i nižší ekologická zátěž pro životní prostředí [13].

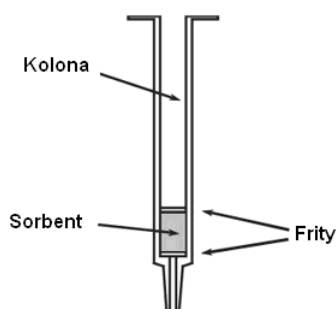
Mezi hlavní nevýhody patří omezená pH stabilita některých sorbentů a obsah silanolů u silikagelových sorbentů, které se mohou ireverzibilně vázat na podobné skupiny analytu a tím rušit výsledné vzorky. Dále to mohou být u konvenčních kolonek, které jsou používány ve vakuových či přetlakových manifoldech, neschopnost jednoduché kontroly stálého průtoku či zabránění vysoušení kolonek. Další relativní nevýhodou ve srovnání s podobnými extrakčními metodami na pevné fázi (SPME) může být vyšší nákladovost a vyšší spotřeba organických rozpouštědel v jednotlivých extrakcích, popř. také časová náročnost [10, 12].

Dnes se objevují stále nové trendy v oblasti extrakce tuhými fázemi. Jsou to metody založeny buď na zcela novém principu, nebo u stávajících metod jejich modifikací. V posledních letech se objevily např.: SPME, MEPS, SBSE, MSE, MSPD či TFC [10, 14].

2.2.1. *Mobilní a stacionární fáze*

Mobilní fází je myšlena ta část chromatografického systému, ve které je vzorek rozpuštěn a která slouží k jeho nanesení na SPE kolonku a k následné separaci balastních látek od analytu [10].

Stacionární fází pak myslíme pevnou část systému, přes kterou prochází mobilní fáze a složky vzorku, přičemž zde dochází k separaci jednotlivých složek na základě jejich fyzikálně-chemických vlastností. Stacionární fáze u SPE je uložena v plastických nebo skleněných kolonkách tzv. cartridges (columns/tubes). Tyto SPE kolonky jsou z části naplněné adsorpčními médii (např. silikagely s navázanými funkčními skupinami), přičemž nežádoucímu úniku částic stacionární fáze je zabráněno vložením sorbentu mezi dvě polyethylenové frity (viz obrázek č. 2) [10, 11].



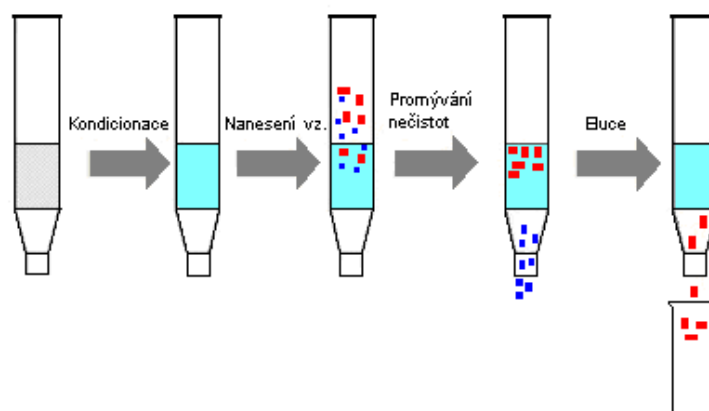
Obrázek č. 2: Schéma SPE kolonky

2.2.2. *Jednotlivé kroky SPE extrakce*

Pro přípravu vzorku je tedy nezbytné jeho rozpuštění. Důležitým krokem je kondicionace kolony. Slouží k zajištění konzistentních podmínek při extrakci. Kondicionační roztoky tzv. „zvlhčí“ funkční skupiny v adsorpčním médiu (např.: u reverzní fáze zpřístupní CH- skupiny), čímž se následně stanou přístupné k interakci. Voda nebo pufr pak odstraní organické rozpouštědlo a zaručí nastavení vhodných podmínek (pH, polarita) pro lepší výsledky extrakce [10].

Následuje nanesení vzorku, čímž dochází k navázání vzorku na stacionární fázi/sorbent. Promývání kolonky nám vymyje balastní látky, které se neadsorbovaly na stacionární fázi. Následným krokem je eluce, kdy pomocí rozpouštědla dojde k uvolnění vzorku z vazby na sorbent a jeho vyplavení spolu s rozpouštědlem. Pro další práci s analytem je

dobře odpařit rozpouštědlo od vzorku např.: zakonzentrování zkoumaného analytu dusíkem [10, 15]. Jednotlivé kroky extrakce jsou popsány na obrázku č. 3.



Obrázek č. 3: Postup extrakce tuhou fází [16]

Extrakti lze provádět dvěma způsoby:

První metodou se vzorek adsorbuje na povrch sorbentu a promývacími roztoky se odstraní balasty. Ve druhém kroku se pak eluuje zkoumaný vzorek.

Druhá metoda je v podstatě obrácená. Po aplikaci vzorku se adsorbují jen balastní látky a v promývacím kroku se vymyjí zkoumané analyty.

2.2.3. Rozdělení SPE na základě převládající interakce

Existují 3 druhy SPE extrakcí, rozděleny jsou na základě polaritý jednotlivých fází. Výběr vhodné fáze se řídí: povahou analytu, rozpouštědlem vzorku a typem interferencí.

2.2.3.1. Extrakce na reverzní fázi

Retenčním mechanismem jsou nepolární/hydrofobní interakce typu Van der Walsových sil. Znamená to, že stacionární fáze je také nepolární a musí být méně polární než roztok vzorku. RP (reverzní fáze) je pojmenovaná podle toho, že v dřívějších publikacích (1960s) byla jako normální fáze myšlena stacionární = polární, tudíž dnes nepolární = reverzní/obracená k normální fázi [10].

Funkční skupiny v takovýchto interakcích jsou alkyly, aryly či alicyklické funkční skupiny. Silikagel jako tradiční nosič má na sobě chemicky nepolární modifikátory (C18, C8, C4, CYH, Ph, CN). Eluční roztoky, které dokáží zrušit interakce sorbent/analyt jsou rozpouštědla typu acetonitrilu a methanolu, či jejich kombinace s pufrů. Jako vzorky jsou vhodné biologické tekutiny, extrakty z tkání, environmentální roztoky atd. Přesněji RP může sloužit k extrakcím různých léčiv, ATB, peptidů, aromatických sloučenin, fenolů, herbicidů, pesticidů, vitamínů a mnoha dalších látek [15, 17].

2.2.3.2. Normální fáze SPE

Normální fáze poskytuje sorpci na polárním povrchu. Jde o polární/hydrofilní interakce typu vodíkových můstků, π - π interakci, dipól-dipól či indukovaný dipól-dipól [10]. Aby docházelo k následujícím interakcím, musí být roztok s analytem méně polární než stacionární fáze. Funkční skupinou v takovýchto interakcích jsou hydroxylové skupiny, karbonyl, aminy či funkční skupiny s rezonančními vlastnosti. Zařazují se zde i adsorpční typy nosičů (Si-OH, hořčnaté silikagely či hliníkové sorbenty) [10]. Eluční roztoky, které se používají na normální fázi SPE, jsou rozpouštědla typu hexanu, toluenu a benzenu v kombinaci s methanolem, isopropanolem či acetonitrilem. Jako eluční roztoky na silikagelech se mohou použít rozpouštědla s eluotropní silou (e°) pod 0,6 (viz tabulka č. 1). Například voda jako eluční roztok se kvůli její adsorpci na funkční skupiny sorbentu nemůže používat. Vzorky jsou často organické extrakty, oleje a velmi polární roztoky [15, 17].

Tabulka č. 1: Eluotropní síla rozpouštědel [18]

Rozpouštědlo	Eluotropní síla (e°)	
Hexan	0,00	Nepolární rozpouštědla ↓ Polární rozpouštědla
Isooktan	0,00	
Toluen	0,22	
Benzen	0,27	
Chloroform	0,31	
Dichlormethan	0,32	
Tetrahydrofuran	0,35	
Diethylether	0,39	
Ethylacetát	0,43	
Aceton	0,45	
Acetonitril	0,50	
20% methanol v diethyletheru	0,63	
Isopropanol	0,65	
40% methanol v ACN	0,67	
Methanol	0,73	
Voda	> 0,73	
Kyselina octová	> 0,73	

Některé zdroje zařazují právě adsorpční extrakce k normálním fázím, neboť jejich princip je shodný s normální fází. Rozdíl je v tom, že jako adsorpční medium slouží nevázané polární sorbenty (typu oxidu hlinitého, hořečnatého silikagelu či prostého silikagelu) [15, 17].

2.2.3.3. Iontově výměnná fáze SPE (Iontoměniče)

Retenčním mechanismem u iontoměničů jsou elektrostatické interakce založené na výměně iontů (rozlišujeme kationtové a aniontové iontoměniče). Charakter sorbentu, nám pak určuje, jaké sloučeniny chceme izolovat. ANEX – jsou nosiče s chemicky navázaným kladně nabitým modifikátorem (primární, sekundární, terciární či kvarterní aminy). KATEX - jsou nosiče s chemicky navázaným záporně nabitým modifikátorem (karboxylová kyselina, benzen- či propylsulfonová kys.). Eluční roztoky, které dokáží zrušit interakce, jsou roztoky s neutralizačními schopnostmi vůči sorbetu [15, 17].

Iontoměničové sorbenty jsou velmi citlivé na kroky kondicionace a nanesení vzorku (např.: pro optimální výsledky extrakce, kolonka nesmí před nanesením vzorku „vyschnout“, popřípadě vzorek se musí nanášet velmi pomalu, nejlépe pak po kapkách). Díky fyzikálně chemickým vlastnostem iontoměničů (velikost pórů 275 Å) dokáží separovat i sloučeniny o velké molekulové hmotnosti (i více než 2000 Da). Jako vzorky slouží vodné i organické roztoky s velmi nízkou molaritou (méně než 0,1M) [10, 15].

2.2.4. *Druhy SPE kolonek a sorbentů*

Kolonky pro SPE extrakce vyrábí značné množství různých výrobců po celém světě. Jednotliví výrobci mají své obchodní názvy, avšak v celku vyrábějí převážně totožné druhy SPE kolonek-sorbentů. Nabídka sorbentů je podobná jako pro HPLC.

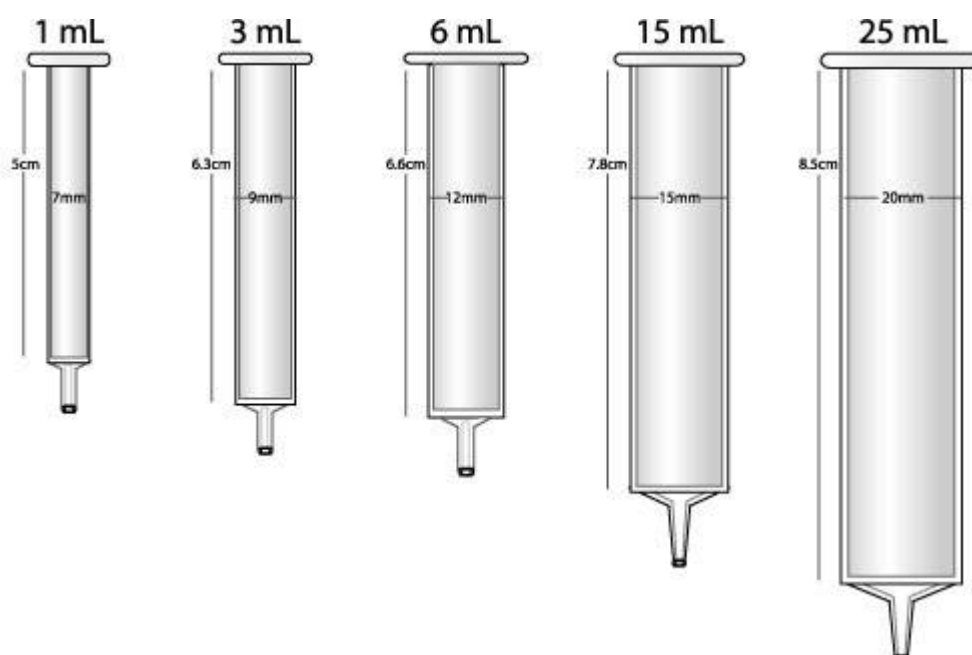
Hlavními světovými výrobci příslušenství pro výrobu vzorků se zastoupením v ČR jsou Supelco (Sigma-Aldrich Co.), ThermoScientific, Phenomenex, Agilent Technologies, dále pak Applied Separation, Biocompare, CNW Technologies, Discovery Science, GSTek, J. T. Baker, Macherey Nagel, Qorpak a mnoho dalších. Samozřejmostí je, že jednotlivé kolonky jsou výrobci testovány na reprodukovatelnost svých parametrů. Testuje se kapacita sorbentu, specifický povrch, velikost pórů a celkový objem pórů, průtoková rychlost, velikost a hmotnost částic, dále i pH povrchu použitého silikagelu, díky čemuž pak mají nosiče zaručeny stejné fyzikálně-chemické vlastnosti. Jednotné množství vázaného uhlíku a rovnoměrné pokrytí povrchu silikagelu umožní reprodukovatelnost analýz na kolonkách [19, 20].

Dnešní sortiment náplní do SPE kolonek nabízí širokou škálu sorbentů. Nabídku SPE kolonek rozšiřují SPE disky, pipetové špičky s fixovanými sorbenty (někdy nazývané Disposable pipette tip extraction – DPX), či destičky s 96 pozicemi (obsah sorbentu 25, 50 a 100 mg) sloužící pro rychlejší práci. Samozřejmostí je dostání i čistých kolonek a sorbentů k vlastnímu naplnění. Výrobci rozdělují své výrobky podle různých kritérií, nejčastěji to je na základě typu zkoumaných vzorků (environmentální, farmaceutické, potravinářské nebo petrochemické vzorky). Další dělení je pak na základě použitého typu stacionární fáze, přičemž silikagelové sorbenty jsou dnes nejpoužívanější [14, 19].

2.2.4.1. Vlastnosti SPE sorbentů a kolonek

Kolonky/sorbenty jsou charakterizovány celou řadou parametrů. Rozlišujeme kolonky skleněné, polypropylenové a nověji i nerezové. Jako samostatný druh jsou brány SPE disky, které odstraňují nevýhody kolonek, jako jsou malá plocha sorbentu vůči šíři sloupce a možnost vzniku kanálek mezi částicemi sorbentu, což může vést k nejednotnému průtoku SPE kolonkou. Navíc SPE disky šetří rozpouštědla a vykazují čistější výtěžky. Plastické kolonky jsou nejvíce používány právě díky svým vhodným vlastnostem a jednoduché výrobě. Skleněné (popř. nerezové) kolonky na druhou stranu mohou být například zahřívány, jsou odolnější a především se používají u vzorků obsahující ftaláty nebo plastifikátory, které by mohli narušit výsledné hodnoty analytu.[19, 21].

Existuje velké množství různých velikostí kolonek, na základě jejich objemových velikostí (uvedeny na obrázku č. 4). Nejčastěji se používají 3 ml SPE kolonky. Jsou ale vyráběny i v dalších objemech 1, 6, 12, 15, 25 i 60 ml, s objemem pak souvisí i množství stacionární fáze [13].



Obrázek č. 4: Základní velikostní druhy kolonek (skutečné měřítko) [22]

Z hlediska vlastností sorbentu je jedna z nejdůležitějších kapacitní schopnost sorbentu. Pro obrácené a normální fáze platí pravidlo, že „obsah zachycených analytů, by neměl být větší než 5 % hmotnosti sorbentu (100 mg sorbentu odpovídá 5 mg zachyceného

analytu“). Kapacita silikátových sorbentů je závislá na procentuálním obsahu uhlíku [11, 13]. Dnes již existují kolonky, které se tomuto pravidlu vymykají. Příkladem je kolonka STRATA-X od firmy Phenomenex a to díky svému nízkému měrnému povrchu (33 μm) a zvláštnímu patentově chráněnému obsahu. Výrobce udává, že kolonka má extrémě vysokou kapacitu blížící se až 15 % [17].

U iontovýměnných sorbentů je třeba počítat s jejich výměnnou kapacitou, která je udávaná v jednotkách meq/g (což zn.: př. kapacita 0,6 meq/g = 1 g sorbentu udrží 0,6 g analyzovaného vzorku) [17].

Dalším důležitým parametrem je velikost zrnitosti, udává se v μm (33, 40, 50, 55, 100, 170, 200 μm). Jednotlivá zrnitost je pak charakteristická pro různé druhy sorbentů. Sorbenty pro SPE mají daleko větší zrnění, než je tomu u kolon pro kapalinové chromatografie, proto lze SPE provádět i při nízkých tlacích. End-capping je pojem udávající, zda jsou silanolové skupiny silikagelu odstíněny a tím jsou znemožněny nežádoucí interakce s bazickými látkami. Charakterický je i tvar (sférický, granulovaný), čistota, váha sorbentu (mg), retenční plocha (m^2/g), pórovitost (udávaná v Å – Ångström, velikost atomů či délek chemických vazeb) [17, 19].

Nezbytným vybavením pro tento druh úpravy vzorku jsou tzv. „manifolds“ (obrázek č. 5) což jsou vakuové zařízení, jenž drží kolonky a zároveň pod vakuem celý proces SPE urychlují. Díky nim může probíhat i více extrakcí najednou. Uvnitř jsou pak vloženy zkumavky, do kterých jsou sbírány jednotlivé frakce extrakce [13, 21].



Obrázek č. 5: Přístrojové vybavení SPE [23]

2.2.4.2. Výběr vhodného sorbentu

Základním požadavkem je znalost co největšího množství informací o vzorku, na základě čehož se pak může vybrat vhodná velikost kolonky, sorbent a tím i fáze extrakce.

Interakce vzorku s tuhou fází (stacionární) musí být výrazně silnější než jeho interakce s kapalnou fází (mobilní), ve které je vzorek solvatován. Přičemž ideálně by se měl vázat jen námi zkoumaný analyt, zbytkové sloučeniny (balasty) by měly mít co nejmenší afinitu k sorbentu (pokud možno nulovou) [11].

Výběr vhodného množství sorbentu se dále řídí pravidly kapacity jednotlivých sorbentů a množstvím vzorku, který chceme extrahovat. Pro velké objemy analytu (nad 1l) se lépe hodí diskové kolony (90 mm disk) [13, 15].

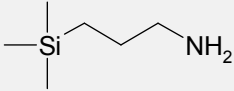
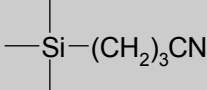
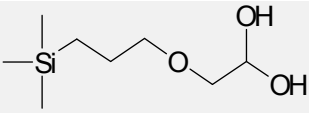
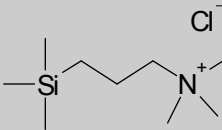
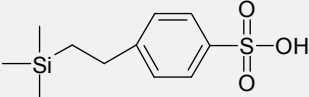
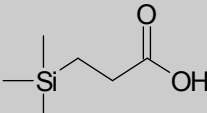
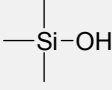
2.2.4.3. Silikagelový sorbent

Jde o nejrozšířenější druh sorbentu, velikost částic je 40 - 63 μm a póry 60 Å. Druhy silikagelových sorbentů jsou určeny jak pro normální, reverzní, tak i pro iontovou fázi extrakce. Použitý druh fáze závisí na složení jednotlivých aktivních substituentů na silikagelovém nosiči [13, 20].

U základních silikagelových sorbentů jako C-8 a C-18 existují jejich obdobné vylepšené formy, které obsahují jiné procentuální zastoupení uhlíku v sorbentu. Označují se především díky jejich enviromentálnímu použití jinými obchodními názvy například jako ENVITM-18 (obchodní název Supelco) [13,19]. Výrobky ENVITM díky svým upraveným vlastnostem mají lepší odolnost ve vysokých pH a také zvýšenou kapacitu. Často jsou vyráběny i jako diskové kolony, které jsou využívány hlavně pro analýzu velkých objemů vzorků vod. [18, 24]

Jednotliví výrobci se jen minimálně liší v parametrech vlastností kolonek (hlavní odlišující parametr je procentuální obsah uhlíků v sorbetech). Jelikož existuje značný počet silikagelových sorbentů, pro přehlednost jsou jednotlivé druhy se základními charakteristikami seřazeny do tabulky č. 2.

Zkratka (obsahují obchodní názvy)	Použití	Vzorec aktivního konce	Aktivní konec	Popis	
C-18	Reverzní fáze		Polymerně vázaný oktadecyl na silikagel (obsahuje 18 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-pro reverzní fáze extrakce nepolárních či mírně polárních sloučenin -vysoké procento uhlíku zvyšuje kapacitu sorbentu -jako matrix slouží ATB, barbituráty, herbicidy, pesticidy, fenoly, steroidy, vitamíny	
C-18 Lt			Monomerně vázaný oktadecyl na silikagel (obsahuje 11 % uhlíku údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-nižší procento uhlíku zvyšuje retenci mírně polárních analytů, zároveň snižuje retenci hydrofobních látek, jež mají vysokou retenci na kolonu C-18	
C-12			Dodecyl vázaný na silikagel	-polaritu má obdobnou jako C-18, avšak díky dodatečnému stericky vloženému kruhu zaručuje velmi specifické separační vlastnosti	
C-8			Oktyl vázaný na silikagel (9 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-pro nepolární i lehce polární sloučeniny -vyráběny také jako disky	
C-4			Butyl vázaný na silikagelový konec	-méně hydrofobní než C-8, většinou určeno pro extrakce peptidů	
C-2			Ethylový zbytek vázaný na silikagel	-pro bazické a spíše polární analyty	
-Ph			Fenyl vázaný na silikagel (7 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-má nižší retenční schopnosti než C-18 -určen primárně pro aromatické analyty	
-CYH			Cyklohexyl vázaný na silikagel	-má schopnost udržet polární analyty, rpo vodné vzorky	
Hisep™ (trademark by Sigma- Aldrich)				Hydrofobní povrch nosiče je pokryt hydrofilní sítí	-určen pro speciální proteinové vzorky -dokáže udržet jen malé molekuly (léčiva) v prostředí reverzní fáze

Zkratka (obsahují obchodní názvy)	Použití	Vzorec aktivního konce	Aktivní konec	Popis
-NH ₂	Normální fáze		Aminopropylová konec vázaný na silikagel (7 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-pro polární slouč. -vyměňuje i slabé anionty za uhlovodíky a slabé organické kyseliny, proto i pro intovyměny (výměnná kapacita je 0,43meg/g)
-CN			Kyanopropylový konec vázaný na silikagel (7 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-pro extrakce málo polárních slouč., lze ji použít i u RP -jako aflatoxiny, ATB herbicide -vyměňuje slabé kationy za uhlovodíky či jiné kationtové sloučeniny
-diol			2,3- dihydroxypropoxyp ropylový konec vázaný na silikagel (7 % uhlíku, údaje společnosti Sigma Aldrich Co.)	-pro polární vzorky při normální fázi
- SAX	Iontově-výměnná fáze		Polymerně vázaný kvarterní amin na silikagel v komplexu s Cl ⁻	-pro extrakce slabých aniontů, vyměňuje aniont organických, nukleových kys., nukleotidů či surfaktantů (výměnná kapacita je 0,14meg/g)
- SCX			Polymerně vázaná benzensulfonová kyselina v komplexu s Na ⁺	-pro extrakce silných kationtů, vyměňuje ionty za ATB, léčiva, org. báze, catecholaminy (výměnná kapacita je 0,8meg/g)
- WCX			Polymerně vázaná karboxylová kyselina v komplexu s Na ⁺	-pro slabé kationy, výměna za jiné kationy, ATB, léčiva, nukleové kys. i báze (výměnná kapacita je 0,14meg/g)
- Si	Bez vázané fáze		Silikagel bez navázené fáze (nejpolárnější sorbenť)	-pro extrakce polárních jako jsou alkoholy, aldehydy, aminy, barviva, herbicide a pesticide, nitrosločeniny, fenoly

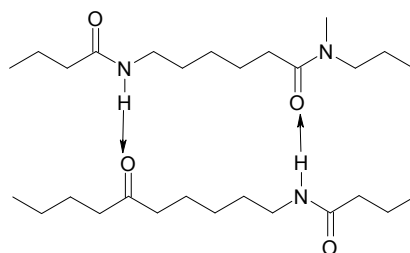
2.2.4.6. *Grafitizovaný neporézní sorbent*

Jde o sorbent na bázi uhlíku, bez navázaných fází, proto se také řadí k adsorpčním extrakčním sorbentům. Jeho unikátní neporézní povrch slouží k extrakci jak polárních, tak i nepolárních látek. Neporézní povrch je vhodný pro rychlé analýzy. Často se používá v enviromentálních analýzách, například k rychlým předseparacím pesticidů (separuje najednou i více než 200 látek) z vod a zeleniny [10, 15].

2.2.4.7. *Pryskyřičné polymerní sorbenty*

Existuje celá řada polymerních sorbentů, mnohdy ještě pod patentovou ochranou výrobců. Mezi velmi rozšířené patří například tzv. „polyamidové pryskyřice“ (obrázek č. 7), obsahující sférické částice u velikosti 80-160 μm . Jsou ideální pro extrakce polárních aromatických sloučenin, například pro fenoly ve vodném prostředí. Zároveň je však lze použít i u nepolárních a středně polárních aromatických vzorků. Jdou použít jak u obrácených, tak i normálních fází SPE. Typickým zástupcem je DPA-6S od firmy Supelco [24].

Dále existuje pryskyřičný sorbent typu styren-divinyl benzen. Jde o vysoce rozvětvený polystyren-divinyl benzenový kopolymer, jenž má díky svému velkému povrchu a vysoké kapacitě hlavní uplatnění v extrakci polárních analytů, zejména vzorků, které nemají adekvátní retenci na C-18 [29]. Je to vysoce rezistentní sorbent vůči extrémně nízkým pH. Nejčastěji využíván pro extrakce aromatických a fenolických vzorků v enviromentálních analýzách vody [13, 24]. Zástupci těchto polymerních sorbentů jsou např. kolona Sample Q PS – DVB od Agilent Tech., či Supelclean ENVI-Chrom P od Supelco [24, 29].



Obrázek 7: Struktura polyamidového-pryskyřičného sorbentu

2.2.4.8. *Ostatní typy sorbentů a nové trendy v SPE sorbentech*

Patentové sorbenty a specifické sorbenty

Jednotliví výrobci pak nabízejí i jiné typy kolon se specifickými vlastnostmi, často i pod patentovou ochranou sorbentu, jako je tomu u kolonky STRATA-X od výrobce Phenomenex. Hlavní specifikou této kolonky oproti klasickým sorbentům na bázi silikagelu je, že má vyšší reprodukovatelnost pro kyselé, neutrální i bazické analyty a je odolná tzv. dekontaminaci, což v překladu znamená vysušení kolonky bez ztráty retenčních vlastností a to i při opakovaném použití. Dále jak už bylo uvedeno výše, má velmi malý měrný povrch (33 μm), což extrémně zvyšuje kapacitu této kolonky (až 6-15 %, oproti konvenčním 5 %). Menší množství náplně pak zvyšuje průtok kolonkou. Její mechanismus retenčních interakcí zahrnuje jak klasické π - π interakce, tak i bipolární a vodíkové vazby. Na základě výrobního procesu je stacionární fáze určena pro reverzní fáze, iontoměničové interakce nebo jsou vyráběny tzv. jako „mixed mode“ kolonky STRATA-X [25].

Zajímavý je také sorbent, od firmy CNW Technologies, z dřevěného uhlí vyrobeného z kokosu, který je speciálně určen pro stanovení nitrosaminů a 1,4-dioxanů z pitné vody [27].

Dalším specifickým sorbentem je Supelclean Sulfoxide SPE od Supelco, který je speciálně navržen pro extrakce polychlorovaných bifenyly (PCB). Sorbent obsahuje sulfoxid (-SO) vázaný na silikagel. Právě atom síry spostředkovává specifickou vazbu s π -elektronovým mrakem z aromatického kruhu PCB [24].

Mixed Mode

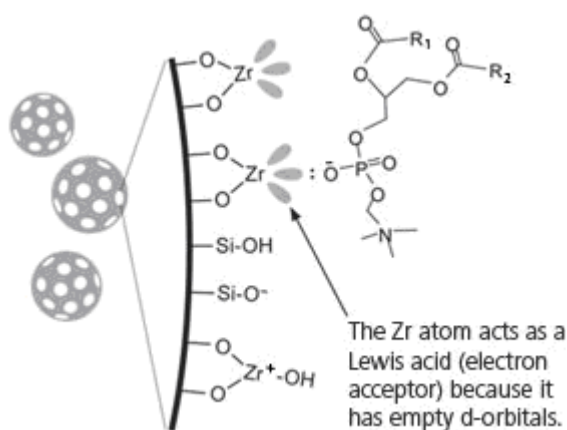
Jsou záměrně používané sorbenty s dvěma rozdílnými funkčními skupinami na stejném povrchu. Příkladem může být situace, kdy rozpuštěné nečistoty interagují jedním mechanismem a analyt oběma. Lze tak použít rozpouštědlo, které eluuje jen interference a analyt zůstane na kolonce vázán dále [10].

Jsou to novější varianty SPE sorbentů, jde o dvojkombinace klasických kolonek (např. silikátové sorbenty + iontoměničové) s unikátními vlastnostmi pro selekci specifických chemických interakcí. Ve výsledku to vede k lepší efektivitě a účinnosti SPE extrakcí. Jednotliví výrobci nabízejí nepřehledné množství kombinací v těchto stacionárních fázích. Jedním z takovýchto druhů je i kolonka AFT od firmy Discovery Science. Jde

o unikátní kombinaci C-18 silikagelu s Al_2O_3 , čímž se dá používat jak pro normální, tak i pro reverzní fázi a je vhodná hlavně pro extrakce aflatoxinů [24, 26, 30].

HybridSPE

Sigma-Aldrich vyrábí zajímavou kolonku HybridSPE, což je kombinace precipitační metody proteinů se selektivní schopností SPE. Krok precipitace proteinů se děje přímo v extrakční SPE kolonce. Slouží buď k zjišťování fosfolipidů biologické plazmy a séra, nebo k odstranění fosfolipidů a proteinů z matričního vzorku, pro získání čistějšího analytu. Mezi silikagelovými nosiči jsou substituovány zirkoniové atomy, jenž díky svému prázdnému d-orbitálu mají vlastnosti elektronového akceptoru a tím taky afinitu k elektor-donorovým skupinám fosfolipidů [24].

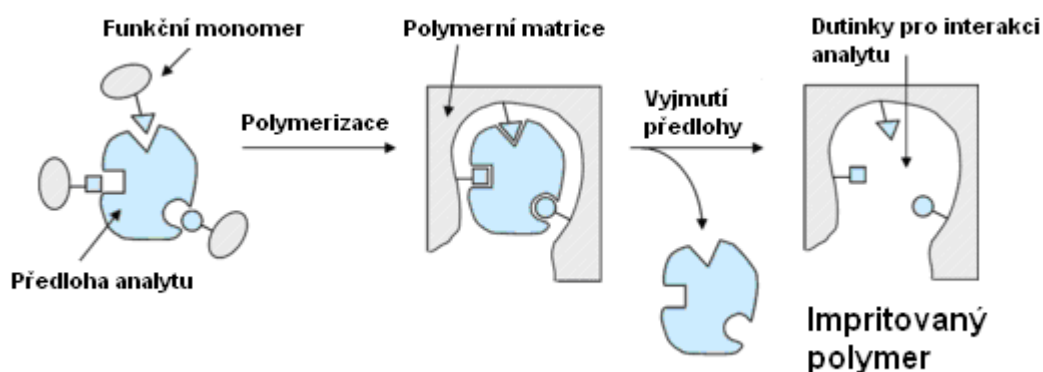


Obrázek č. 8: Interakce HybridSPE zirkoniového sorbentu s fosfolipidovým vzorkem [31]

Pro kapalinovou chromatografii již delší dobu existují čistě zirkoniové sorbenty (na bázi ZrO_2 , obrázek č. 8). Hlavní nevýhodou silikagelových reverzních fází je jejich malá tepelná a chemická stabilita, kterou právě zirkoniové sorbenty odstraňují. Přičemž se odlišují ve své selektivitě a retenci [32]. Přestože dnes jsou již silikagelové sorbenty stabilnější, převládá trend ve vývoji stále nových materiálových možností uplatňujících se v chromatografii. A ačkoliv HybridSPE jsou kolonky pro extrakce tuhou fází a jsou jen kombinací silikagelových a zirkoniových atomů, určitý nový směr pro další vývoj SPE sorbentů mohou být právě ony.

Molecularly imprinted polymers (MIPs)

MIPs v překladu znamená „vtisknuté molekulární polymery“. Jde o novější typ sorbentů. Pomocí MIPs lze separovat cílený analyt, a to stanovením s vysokou selektivitou a kvantifikací z komplexní matrice. Hlavní výhodou MIPs je možnost připravit selektivní sorbent pro stanovení vlastního analytu. Rozlišujeme 3 cesty vtisknutí monomerní předlohy do polymeru (kovalentní, nekovalentní vtisknutí či zkřížení obou postupů). Dalším krokem je polymerizace vyrobené matrice a následné odstranění předlohy (obrázek č. 9).



Obrázek č. 9: Tvorba MIPs [33]

Metody přípravy polymerních matric pro analyt se stále vyvíjejí, a tudíž se objevují stále nové matrice pro další látky. Hlavní výhody této metody tkví ve vysoké selektivitě, stabilitě a nízké nákladovosti s možností selektivního obohacení analytu z rozdílných matric [10, 14].

Výrobci dnes nabízejí již komerčně vyráběné MIPs pro různé látky (amfetamin, β -agonisty, β -blokátory, chloramfenikol, riboflavin, či tabákový nitrosamin z biologických tekutin). MIPs se dále užívají také v imunoanalýzách pod názvem MIAs (molecularly imprinted sorbent assays), jejich využití je však stále relativně malé [14, 19].

Restricted access material (RAM)

V českém překladu to znamená materiál s omezeným přístupem. RAM představuje speciální třídu sorbentů, které oddělují biologické vzorky od proteinové matrice a zbytků analytu na základě molekulárních vlastností. [10, 34]

Principem tohoto sorbentu je oddělení nízkomolekulárních sloučenin od makromolekul, příčinou je speciálně chráněný povrch sorbentu. Obsahuje buď chemicky vázané polymerní síť nebo fyzikální „průduchy/bariéry“, jimiž velké makromolekuly nedokáží projít a tak zůstávají na povrchu tohoto materiálu. Vnitřní stavbou je hydrofobní vrstva, která je oddělena od hydrofilní vnější vrstvy právě těmito bariérami. Na základě povahy bariér se rozdělují RAM s fyzikálními bariérami (reverzní fáze, alkyl-diol silikagel, porézní silikagel kombinovaný s ligandy) a RAM s chemickými bariérami (semipermeabilní membránový povrch, silikagel s vázanými proteiny, chráněné hydrofobní fáze). Tyto sorbenty se vyznačují velikou životností (200× použitelnost). Novým trendem je kombinace RAM-MIPs sorbentu. Tento unikátní sorbent byl vyvinut pro redukce nescifických interakcí u vzorku biologických materiálů obsahujících léčiva. Sorbent má do budoucna perspektivu například v selekci a kontrolování hladin léčiva v simulovaných gastrointestinálních tekutinách [10, 14].

„Bezfrítový“ sorbent

SOLA® je patentový SPE produkt firmy ThermoScientific. Jde o první „bezfrítový“ produkt svého druhu. Kombinuje jak polyethylenové frity, tak i stacionární fázi do jediné složky. Tento produkt redukuje na minimum charakteristické problémy spjaté s tradičními SPE kolonkami, jako jsou tvoření kanálků v sorbentu, „odloupnutí“ frity, či nekonzistentní sorbentní materiál. Tím poskytuje daleko vyšší reprodukovatelnost svých analýz, vyšší úroveň čistoty extraktu a navíc má i nižší nároky na množství rozpouštědla. Výrobce tento produkt nabízí v trojím provedení podle stacionární fáze (jako reverzní fázi, mixovaný mod pro kationtové výměny a mixovaný mod pro aniontové výměny) [35, 36].

2.3. Další metody přípravy vzorků tuhou fází

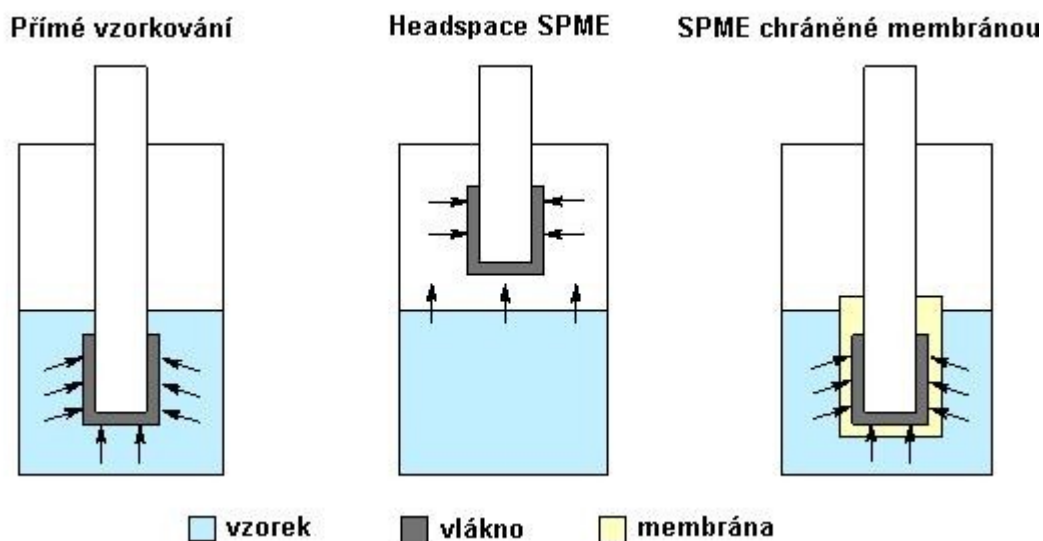
2.3.1. Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)

Tato metoda byla vyvinuta v 90. letech na pracovišti University of Waterloo v kanadském Ontariu, týmem Januse Pawliszyna, a to přímo pro spojení s GC a HPLC. Jde o moderní, rychlou a účinnou metodu s použitím minimálního množství extrakčního rozpouštědla. Vznikla modifikací SPE, liší se jen technologickým provedením [37].

Malé množství sorbentu/stacionární fáze je nanášeno na tenká vlákna, která jsou vyrobena z křemíkových polymerních vláken. Tyto vlákna jsou zasunuta do ocelových jehel, které chrání sorbent při přenosu do analytických přístrojů. Postup práce začíná vložením vlákna do vzorků analytu, přičemž dochází k adsorpci vzorků na stacionární fázi vlákna. K dosažení adsorpční rovnováhy je třeba počkat různě dlouhou dobu, která se odvíjí od vlastností vzorků a sorbentů (2-30 min). Poté jsou celá vlákna přesunuta do analytických přístrojů (buď GC nebo HPLC). Celý systém může být automatizován. Podle povahy polymerní vrstvy vlákna (polární - polyakryláty, nepolární - polydimethylsiloxan) nebo polydimethylsiloxan-divinylbenzen jsou vzorky na povrch buď absorbovány popř. adsorbovány (na stacionární fázi) [38, 39].

Stejně jako u SPE se volbou vhodného sorbentu dosáhne lepších výsledků metody, ať už z hlediska sorpční selektivity, tak i maximálního výtěžku. Mezi výhody této metody patří rychlost, jednoduchost, cenová výhodnost, široké spektrum použití a hlavně není třeba žádných organických rozpouštědel pro mobilní fáze. Přesto tato metoda může být zatížena relativně vysokým počtem chyb, a proto se musí hodnotit spolu s interním standardem (s obdobnými extrakčními vlastnostmi jako analyt) [39, 40].

Základní metoda SPME (tzv.: přímé vzorkování = ponoření, DI-SPME) byla postupem času rozvinuta do dalších modifikací: tzv.: Headspace SPME a SPME chráněné membránou. Headspace metoda je založena na vytvoření rovnováhy mezi plynnou fází a pevným vzorkem (obrázek č. 10). Po vložení vlákna dochází k rozdělení molekul analytu mezi polymerní vrstvu a plynnou fází podle afinity. Poslední technika je založena na obdobném principu jako Headspace SPME s tím rozdílem, že je zde použita membrána sloužící k ochraně potaženého vlákna, přes kterou mohou procházet jen určité složky analytu (viz obrázek č. 10) [14, 41].



Obrázek č. 10: Typy provedení SPME [41]

2.3.2. Mikroextrakce pomocí zabalených sorbentů (MEPS)

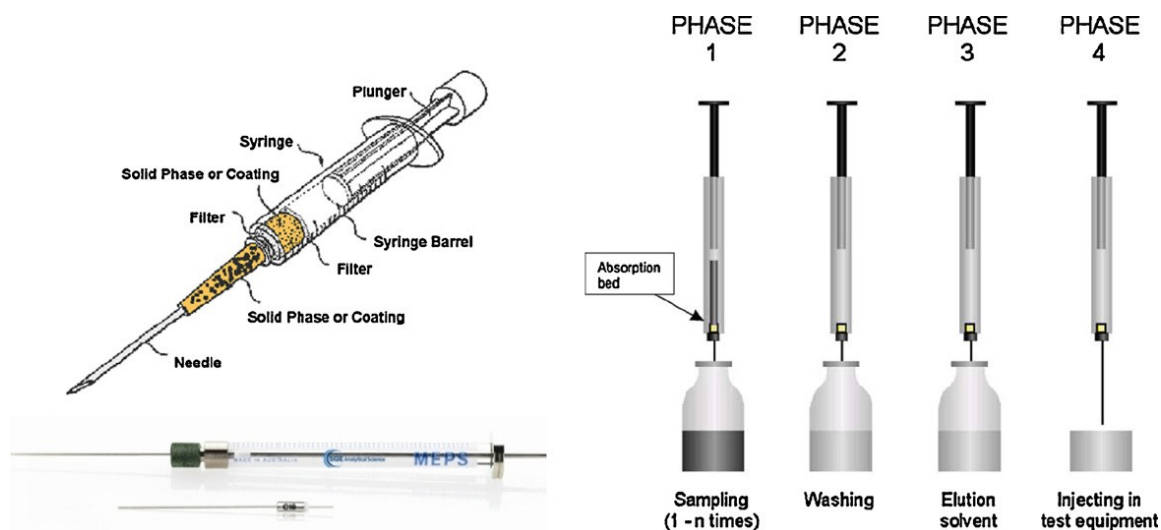
Mikroextrakce pomocí zabalených sorbentů – Microextraction by packed sorbent (MEPS), je novější technika pro úpravy vzorků. Byla vyvinuta firmou ASTRA ZENECA jako velmi slibná metoda pro extrakce léčiv a metabolitů z biologických vzorků. Metoda může být plně automatizovaná a propojena s GC a HPLC [14].

U MEPS (obrázek č. 11) je 1-2 mg pevného sorbentu uloženo buď v insertu injekční stříkačky, nebo je mezi insertem a injekční jehlou sorpční kolona. Jako sorbenty se používají tradiční silikagelové stacionární fáze nebo nověji RAM či MIPs sorbenty. Tyto injekční jehly obsahující sorbenty mohou být používány i opakovaně (až 100× pro sérové vzorky a 400× pro vodné vzorky), což je ve srovnání s SPE mnohonásobně více (podle některých studií je znovupoužitelnost SPE sorbentů jen 3-4x) [14].

MEPS má ve srovnání s SPE také nižší spotřebu rozpouštědel a nižší časovou náročnost. MEPS může být používáno na komplexnější vzorky (myšleno různorodostí obsahu analytu - plasma, organické solventy), oproti tomu např.: SPME je daleko citlivější na čistotu vzorku [14].

Hlavní nevýhodou je možnost vzniku „bublin“ v sorpčních jehlách a horší spojení off-line práce s kapalinovým chromatografickým systémem. U off-line metody MEPS má pro výslednou výtěžnost analytu klíčovou vypovídající hodnotu rychlost zmáčknutí

injekční stříkačky (příliš rychlý pohyb zapříčiní nedsorbování analytu, což pak může výsledné hodnoty negativně ovlivnit) [14].



Obrázek č. 11: Sorpční jehla a postup MEPS [14]

2.3.3. *Stir bar sorptive Extraction (SBSE)*

SBSE je volně přeloženo jako mikroextrakce polymerní fází s míchadlem. Jde o bezropouštědlovou techniku extrakce, vyvinutou v roce 1999. Je v podstatě založena na stejných principech jako SPME. Namísto čistě polymerně potaženého vlákna jako u SPME, je zde navíc magnetické míchadélko, jenž je uloženo ve skleněném pouzdře a na něm je až vrstva stacionární polymerně vázané vrstvy (nejčastěji se používá polydimethylsiloxan – PDMS, viz obrázek č. 12). Extrakce probíhá ve vodném vzorku při zapnutém míchání. Po ukončení extrakce je celé míchadélko vloženo do vialky a uloženo do zařízení na termální desorpci analytů, jenž pak může být spojeno s GC. Oproti SPME je desorpční proces mnohonásobně pomalejší [14, 41].



Obrázek č. 12: Schéma zařízení pro SBSE [41]

2.3.4. *Monolith spin extraction (MSE)*

Monolitní rotující extrakce je založena na jiném druhu sorbentu (monolitickém, který je složen z jediného kusu pórovitého materiálu). Monolitické sorbenty poskytují oproti tradičním porézním částicím v kolonkách daleko rychlejší průtok (až 10 ml/min, bez ztráty adsorpčních schopností), kterého u konvenčních extrakcí (SPE) lze dosáhnout jen při maximálních tlacích. V podstatě se jedná v této metodě o spojení monolitických kolonek s centrifugou (po každém kroku extrakce dochází k centrifugaci). V takovýchto spin kolonách lze jednoduše kontrolovat průtok. Tato metoda se zatím používala v analýzách amitrazu a dibucainu v lidských sérech s velmi vysokými výtěžky. Přesto je metoda relativně nová a čas teprve ukáže její další přínos [14].

2.3.5. *Turbulent-flow chromatography (TFC)*

Principem je oddělení malých molekul analytu od makromolekulární matrice na základě rozdílného koeficientu difúze. Zlepšení této separace se dosáhlo díky provedení turbulencí na začátku extrakce. Tyto turbulence způsobují tvorbu turbulentního víru, čímž se mění proudění částic z parabolického na chaotické turbulentní proudění (mění se tak i rychlost průtoku kolonou), které pak odděluje molekuly na základě jejich molekulárního koeficientu. Nedostatkem je nižší životnost kolon používaných v TFC [14, 42].

2.3.6. *Matrix solid-phase dispersion (MSPD)*

Metoda byla objevena na Státní Univerzitě Veterinární Medicíny v americké Louisianě, kde byly pomocí této metody identifikovány, izolovány a kvantifikovány veterinární léčiva v hospodářských zvířatech. Tato metoda významně redukuje časovou náročnost a spotřebu rozpouštědel ve srovnání s tradičními přípravami vzorků pomocí SPE [10].

Principem je smísení matrice vzorku a sorbentu (C-18). Před smísením dochází pomocí mechanického namáhání (např.: drcení, mletí vzorku tkání) matrice k roztrhání struktury tkání a tento analyt se rozptýlí přes povrch C-18. Dochází při tom k porušení membrán buněk mechanickými a hydrofobními silami a zároveň nastane uvolnění lipidů z organických vzorků. Tento proces zapříčiní, že vzorek a polymerní fáze se stane

lépe mísitelná, což dovolí materiálu, aby se mohl snadněji vložit do kolonky. Kolonka se může naplnit i dalšími typy sorbentů (Florisil®). Následuje jejich stlačení a zároveň adsorpce analytů na sorbent. Poté může okamžitě dojít k eluci analytů (často jen pomocí vody). Z toho plynou výhody oproti klasické SPE, jako jsou časová nenáročnost, úspora rozpouštědel a hlavně izolace a extrakce v jediném kroku, čímž se eliminují náročné kroky SPE. Nicméně přesto je tato metoda velmi náročná na praktické provedení. Slouží k extrakcím širokého spektra biologických analytů (léčiva, biologický a přírodní materiál, proteiny atd.) [10, 43].

2.4. HPLC

High Performance Liquid Chromatography, česky vysokoúčinná kapalinová chromatografie, je řazena mezi kolonové-kapalinové separační metody. HPLC dnes patří mezi běžné a nepostradatelné chromatografické postupy v různých odvětvích analýz, a to především díky neustálým zlepšováním jejich možností. Ať už je to neustálé zkracování a zúžování kolon, zmenšování velikostí sorbentů, automatizace či neustálý vývoj LC-MS [44].

HPLC umožňuje jak rozdělení jednotlivých složek analytu, tak i selektivní detekci. Z HPLC záznamu lze zjistit detailní informace o identitě, obsahu a čistotě analyzovaného vzorku. Navíc proti GC (plynová chromatografie) dokáže analyzovat širší spektrum látek, neboť není třeba jejich převedení na těkavé látky [44, 45].

Kvalitativní charakteristikou u HPLC záznamu je retenční (eluční) čas, jenž udává čas od nástřiku vzorku k maximu píku. Některé UV detektory umožňují v maximu píku sejmout UV spektrum. Kvantitativní charakteristikou je pak plocha (popř. výška) chromatografického píku [45].

Chromatografické HPLC kolony pro analytické účely jsou nejčastěji 5-25 cm dlouhé o vnitřním průměru 2,1-4,6 mm, vyrobeny z nerezové oceli či skla. Kolony jsou naplněny stacionárními fázemi, které jsou často shodné či podobné sorbentům používaných v jiných chromatografických metodách (např. SPE, GC) [45].

3. Cíl práce

Záměrem je vyvinout optimální metodu pro čištění alkylaminoderivátů azaftalocyaninů (Bio-AzaPc) od balastních látek (OGN, AzaPc) pomocí extrakce tuhou fází. Cílem práce je poznat chování Bio-AzaPc na SPE kolonkách při změnách kondicionace, pH prostředí, molarity pufru, či ve složení jednotlivých extrakčních roztoků. S tím také souvisí určení ideálního poměru promývacích a eluačních roztoků k získání co nejvyšší výtěžnosti metody.

Tato SPE metoda tak bude alternativou k již vyvinuté metodě čištění Bio-AzaPc pomocí HPLC [9].

4. Praktická část

4.1. Chromatografický materiál, chemikálie, přístroje

4.1.1. Laboratorní pomůcky

Laboratorní pomůcky

- Odměrné baňky, odměrné válce, kádinky, pipety, zkumavky, mikropipety a špičky.

Chemikálie

- Acetonitril (Merck, ČR), methanol (Merck, ČR), 100% kyselina octová (Fluka, USA), $\geq 99,5\%$ triethylamin (Fluka, USA), čištěná voda byla připravena pomocí Millipore purification system (Schwalbach, Německo).

- Analyzované vzorky byly bionjugáty alkylaminoderivátů azaftalocyaninů (z katedry Farmaceutické Chemie).

- Q21 - sekvence oligonukleotidů:

5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA - Q - 3'

- G6 - sekvence oligonukleotidů (delší):

5'- GAA GTC GGG TGG TCA AAA AGC AGA TTT TT - Q - 3'

- J6 - sekvence oligonukleotidů (kratší):

5'- TC GGG TGG TCA AAA AGC AGA - Q - 3'

Přístroje

- VisiprepTM SPE Vacuum Manifold (Supelco, USA), HPLC sestava (Shimadzu, Japonsko), acidimetr 333 (Drupota, ČR), UV-Vis spektrofotometr (Shimadzu, Japonsko).

4.1.2. *SPE - Extrakce tuhou fází*

Zkoušené extrakční kolony

- DSC-Ph 500 mg/3 ml, DSC-8 500 mg/3 ml, DSC-18 a DSC-18Lt kolonka od firmy Supelco.
- STRATA-X, STRATA Phenyl 500 mg/3 ml kolonky od firmy Phenomenex.
- HyperSep Phenyl 100 mg/1 ml 100PK od firmy ThermoScientific.
- Chromabond C₄ 100 mg/1 ml od firmy Macherey-Nagel.

Příprava 2 M triethylamonium acetátu (dále jen TEAA)

- Pro přípravu 200 ml 2M TEAA, se do 121 ml čištěné vody postupně přidávalo 24 ml kyseliny octové.
- Následně se za stálého míchání opatrně přilávalo 55 ml triethylaminu.
- Nakonec se upravilo pH na 7,0.

Příprava extrakčních roztoků pro SPE

- Jako promývací a eluční roztoky se připravovaly roztoky z acetonitrilu (dále jen ACN) nebo methanolu (dále jen MeOH), kde vodnou část roztoku tvořil 50mM TEAA.

Provedené pokusy

- Prvotní experimenty vycházely z extrakce a purifikace oligonukleotidů v publikaci THURMAN E. M. [10], kde byla popsána SPE metoda pro čištění oligonukleotidů (kondicionaca i následná extrakce). Jako extrakční rozpouštědlo byl použit MeOH v TEAA, pro srovnání se prvotní SPE provedli v ACN jako silnějším rozpouštědlem a až pak následně v MeOH.
- Byl sledován vliv změny organického rozpouštědla, kondicionačních podmínek, molarity pufru, objemu extrakčních roztoků a změny jejich pH roztoků na vlastnosti extrakce.
- Dále se zkoušely testy na reprodukovatelnost, výtěžnost metody, aplikaci SPE na kratší a delší oligonukleotidové řetězce Bio-AzaPc a nakonec srovnání nejlepší SPE metody s již vyvinutou semipreparativní metodou na HPLC [9].
- Jednotlivé pokusy teoretické práce jsou shrnuty v tabulce č. 3 (pozn.: tučně a podtržnuté jsou zvýrazněné změny parametrů extrakce).

Tabulka 3: Souhrn provedených SPE experimentů

<u>Název experimentu</u>	<u>SPE Kolonky</u>	<u>Organické rozpouštědlo</u>	<u>Kondicionační podmínky</u>	<u>Promývací roztoky</u>	<u>Eluční roztoky</u>	
Zkoušení optimální kolonky	DSC-Ph, DSC-18 a 18LT, C-8	ACN	V systému ACN/TEAA	Různé chování - 10-90% ACN/TEAA		
Prvotní pokus	DSC-Ph 500 mg/3 ml		3 ml 100% ACN 3 ml 50mM TEAA nanesení vzorku 100 µmol (dále jen n. v.)	3 ml 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55% ACN		
Změna kondicionace			3 ml 100% ACN 5 ml 50mM TEAA n. v.	3 ml 30% ACN	3 ml 50%, 55% a 60% ACN	
Změna molarity pufru			3 ml 100% ACN 5 ml 100mM TEAA n. v.	3 ml 30% ACN (100 mM TEAA)	3 ml 50%, 55% ACN (100 mM TEAA)	
Změna org. rozpouštědla na MeOH			DSC-Ph 500 mg/3 ml	3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	3 ml 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 80% MeOH	
Zvýšení molarity pufru				3 ml 100% MeOH 5 ml 100mM TEAA n. v.	3 ml 65% MeOH	3 ml 80%, 90%, 95% MeOH
Zvýšení objemů promývacích roztoků		3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.		6 ml 65% MeOH	6 ml 80%, 90%, 95% MeOH	
Změna kondicionace a snížení molarity pufru	DSC-Ph 500 mg/3 ml	3 ml 100% MeOH 3 ml 50% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.		3 ml 65% MeOH	3 ml 80%, 90%, 95% MeOH	
		3 ml 50% MeOH 5 ml 20mM TEAA n. v. 5 ml 20mM TEAA		3 ml 65% MeOH (20mM TEAA)	3 ml 80%, 90%, 95% MeOH (20mM TEAA)	
		3 ml 100% MeOH 5 ml 20mM TEAA n. v. 5 ml 20mM TEAA		3 ml 65% MeOH (20mM TEAA)	3 ml 80%, 90%, 95% MeOH (20mM TEAA)	
		3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v. 5 ml 20mM TEAA	3 ml 65% MeOH (20mM TEAA)	3 ml 80%, 90%, 95% MeOH (20mM TEAA)		
Vliv změny pH	DSC-Ph 500 mg/3 ml	MeOH	3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	3 ml 65% MeOH pH 5,8	3 ml 80%, 90% MeOH pH 5,8	
			3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	3 ml 65% MeOH pH 6,8	3 ml 80%, 90% MeOH pH 6,8	
			3 ml 100% MeOH 5 ml 5 mM TEAA n. v.	3 ml 65% MeOH pH 7,4	3 ml 80%, 90% MeOH pH 7,4	
Záměna pufru TEAA za vodu	DSC-Ph 500 mg/3 ml	MeOH	3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	3 ml 30% MeOH vodná fáze jen H₂O		
			3 ml 100% MeOH 5 ml H₂O n. v.	3 ml 5%, 7,5%, 10%, 20%, 30%, 50% MeOH vodná fáze 50mM TEAA		
			3 ml 100% MeOH 5 ml H₂O n. v.	3 ml 5%, 10%, 20% - vodná fáze jen H₂O		

Reprodukovat. metody (3x)			3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	9 ml 55% MeOH	3 ml 80% MeOH
Aplikace metody na kratší a delší řetězce AzaPc			3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	9 ml 55% MeOH	3 ml 80% MeOH
Výtěžnost metody (porovnání s neextrahovaným vzorkem)			3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	9 ml 55% MeOH	3 ml 80% MeOH
Experimenty s jinými SPE kolonkami	DSC-8, STRATA-X, STRATA-Phenyl, HyperSep Phenyl, Chromab. C4		3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v. (popř.: 20 µmol)	Různé chování - 10-90% ACN	
Extrakce semipreparativní kolonou na HPLC	DSC-Ph		3 ml 100% MeOH 5 ml 50mM TEAA n. v.	9 ml 55% MeOH	3 ml 80% MeOH

4.1.3. *Kapalinový chromatografický systém*

HPLC sestava Shimadzu (Japonsko)

- Dvě čerpadla LC- 20AD
- Degaser DGU-20A₃
- Autosampler SIL-20AC
- Termostat CTO-20AC
- Detektor PDA SPD-M20A
- Komunikační jednotka CMB-20A
- Software LC Solutio ver. 1.22 SP1

HPLC kolony

- HYPERSIL BDS® (ThermoScientific) C-18 100 mm x 4,6 mm, velikost částic 3 µm.
- HYPERSIL GOLD® (ThermoScientific) 150 mm x 10 mm, velikost částic 5 µm.

Příprava mobilní fáze

- Složka A (mobilní fáze) byla připravena smísením 12,5 ml 2M TEAA, 60 ml ACN a doplněním čištěné vody do 500 ml baňky. Složkou B byl 100% ACN.

Chromatografické podmínky

- Vycházely z práce KAMINSKÉ [9].

Upravené podmínky pro analytickou metodu

- kolona: HYPERSIL BDS® (ThermoScientific) C-18 100 mm x 4,6 mm, velikost částic 3 µm
- typ analýzi: gradientová eluce
 - A:B – 0-18,4 min (0 % B), 18,5 min (85 % B), 30,5 min (85 %), 31,0-36 (0 % B)
- délka testu: 36 min
- teplota cely: 42 °C
- teplota kolony: 40 °C
- detekční modul: D2&W lampa (260 – 673 nm)
- rychlost průtoku: 1 ml/min
- vstříkovaný objem vzorku: 35 µl

Upravené podmínky pro semipreparativní metodu

- kolona: HYPERSIL GOLD® (ThermoScientific) 150 mm x 10 mm, velikost částic 5 µm
- typ analýzy: izokratická eluce
 - poměr složky A:B (57:43)
- délka testu: 25 min
- teplota cely: 42 °C
- teplota kolony: 40 °C
- detekční modul: D2&W lampa (260 – 673 nm)
- rychlost průtoku: 1,5 ml/min
- vstříkovaný objem vzorku: 100 µl

5. Výsledky a diskuze

Jako prvotní krok práce bylo zkoušeno chování různých SPE kolonek pro extrakce Bio-AzaPc a hledána neoptimálnější SPE kolonka. Na základě publikace THURMAN E. M. [10] se zvolila kolonka DSC-Ph od Supelco. Při pohledu okem bylo jasně vidět, že se nejen vzorek dobře na sorbent adsorbuje, ale i ve vyšších koncentracích ACN snadno eluuje a tudíž pro další pokusy byla právě tato kolonka vhodně zvolena. Pro porovnání se prováděly testy s C8, C-18 a C-18Lt SPE kolonkami. Vzorek vykazoval daleko vyšší retenci na těchto kolonkách, ty pak zůstávaly nadále zbarvené i při použití promývacích roztoků s vysokým obsahem ACN (popř. i THF).

Zjištění extrakčních poměrů, purifikační změny v ACN

U následných pokusů na fenylové kolonce byly sbírány jednotlivé frakce promývacích roztoků do zkumavky a okem se zároveň sledovalo, v jakých koncentracích ACN již docházelo k vymývání barevně zbarvených Bio-AzaPc, s cílem zjistit optimální promývací a eluční rozmezí analytu v ACN. Ukázalo se, že již okolo 35 % ACN se pravděpodobně eluovala část vzorku Bio-AzaPc.

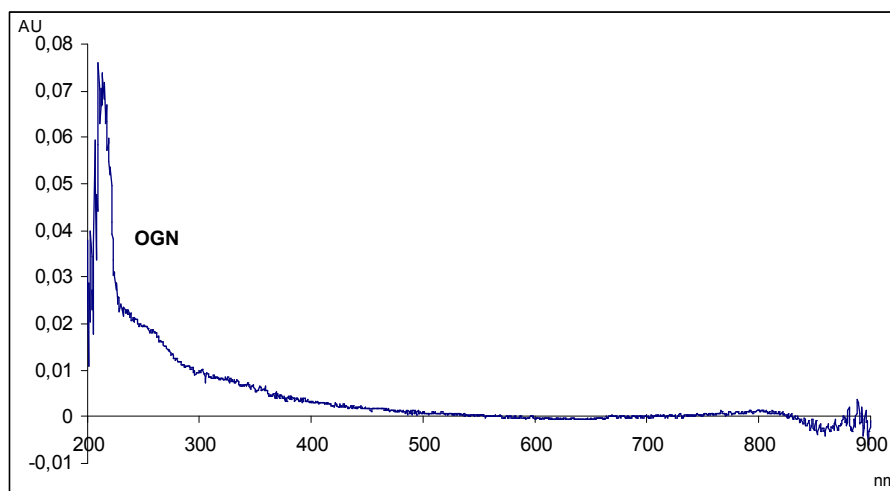
Jednotlivé frakce byly proměřovány na spektrofotometru SHIMADZU proti 40% acetonitrilu jako kontrolnímu roztoku. Z prvotních spektrofotometrických výsledků na ACN bylo zřejmé, že již v nižších koncentracích ACN docházelo k vymývání volných oligonukleotidových řetězců a jejich zbytků (dále jen OGN), naopak při koncentracích okolo 60% ACN se absorpční pás Bio-AzaPc i OGN již skoro neobjevoval.

Po naadsorbování biokonjugátů azaftalocyaninů na sorbent kolonky se zjistilo, že jako promývací roztoky (které ještě neuvolňují Bio-AzaPc z kolonky) pro oligonukleotidy se hodí nižší koncentrace ACN (30 %, 35 %, viz obrázek č. 13), přičemž koncentrace nad 40 % ACN (viz obrázek č. 14) jsou již určeny k eluci Bio-AzaPc.

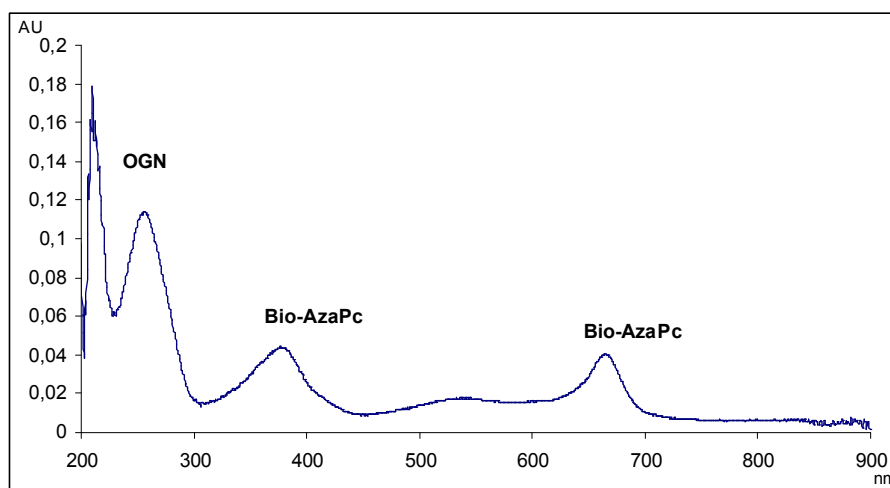
„Vysušení“ vzorku po jeho nanesení na kolonku před jeho následnou extrakcí bylo ve srovnání s pokusem bez něj o něco horší, avšak ve výsledku byl tento rozdíl naprosto nepatrný. Nejspíš tak mohlo „vysušením“ kolonky dojít k nepatrnému „uzavření“ funkčních skupin sorbentu.

I podle HPLC 60% eluát již neobsahoval relevantní hodnoty oligonukleotidových řetězců či Bio-AzaPc. Tudíž zvýšení síly organické části eluačních roztoků nad 60% ACN již nemá vliv na další vyplavení analytu. Přesto však kolonka stále zůstávala slabě

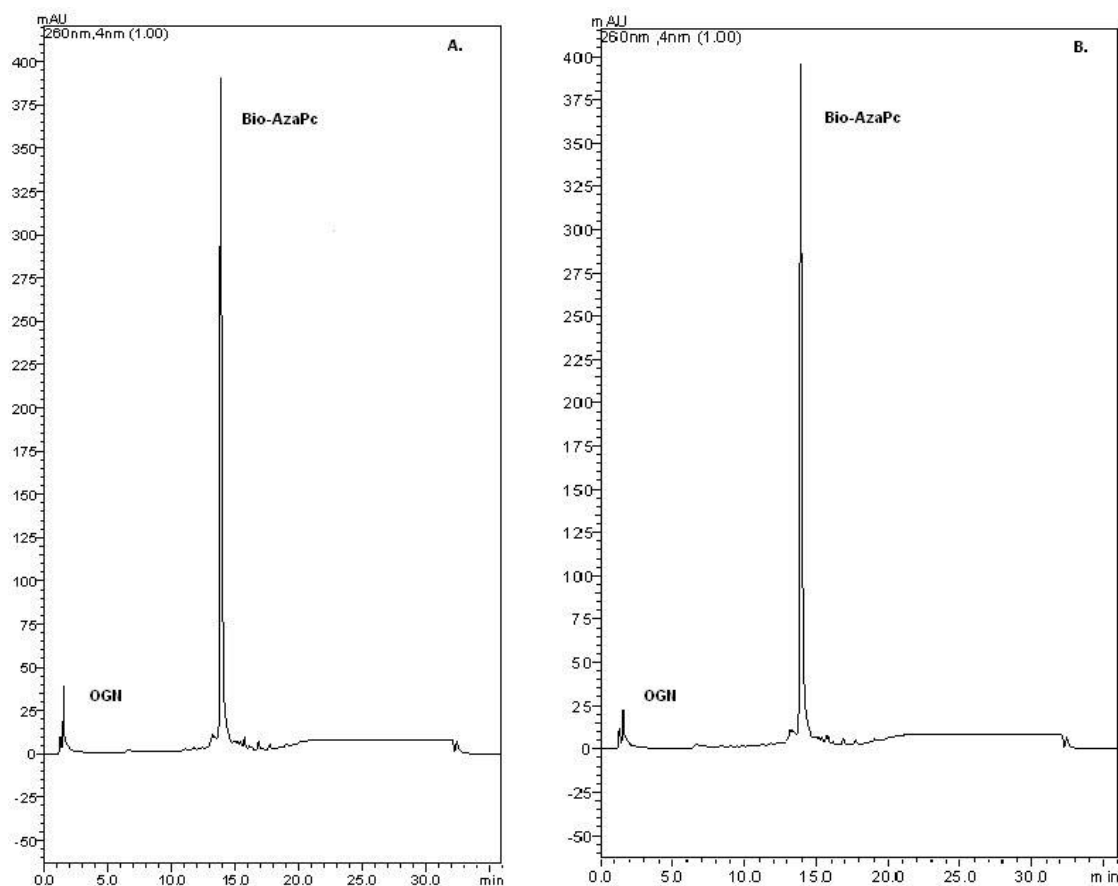
zbarvená (zbytkové zbarvení). HPLC analýza potvrdila, že se biokonjugáty azafthalocyaninů nejvíce eluovaly při koncentraci 50 % ACN.



Obrázek č. 13: UV záznam 20 % roztoku ACN



Obrázek č. 14: UV záznam 40 % roztoku ACN



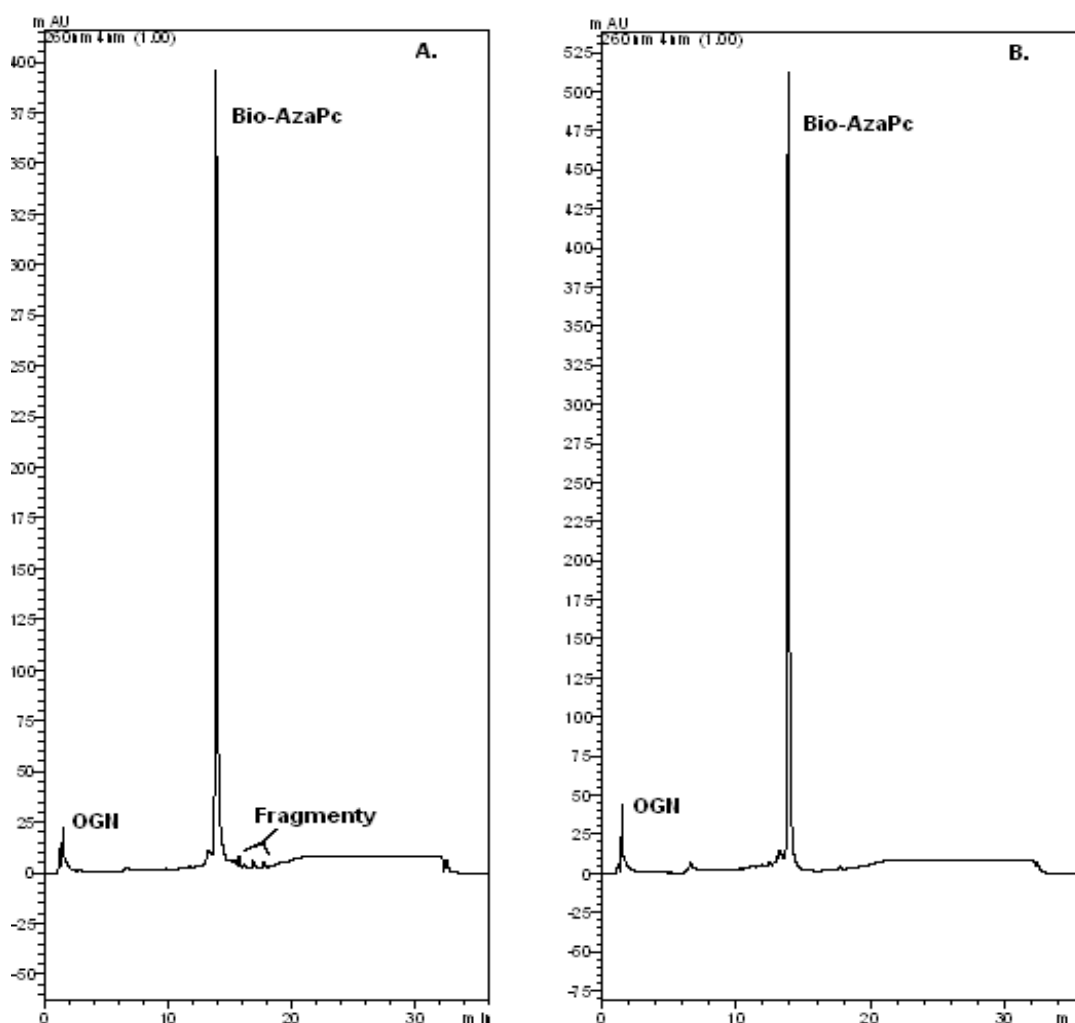
Obrázek č. 15: A. 55% ACN/50mM TEAA, B. 60% ACN/ 100mM TEAA

Se změnou molarity z 50mM na 100mM TEAA, docházelo klasicky v 30% ACN k promývání jen oligonukleotidů. Část Bio-AzaPc se při pozorování okem eluovala až při 55% ACN, většina pak při 60% eluátu. Z toho plyne, že se zvětšením molarity se nepatrně zvýšilo rozmezí koncentrace elučního roztoku potřebného pro uvolnění Bio-AzaPc z kolonky. Obrázek č. 15 ukazuje, že výsledné hodnoty plochy píků v 55% ACN (v 50mM TEAA) proti 60% ACN (v 100mM TEAA) jsou jen minimálně odlišné.

Srovnání MeOH a ACN

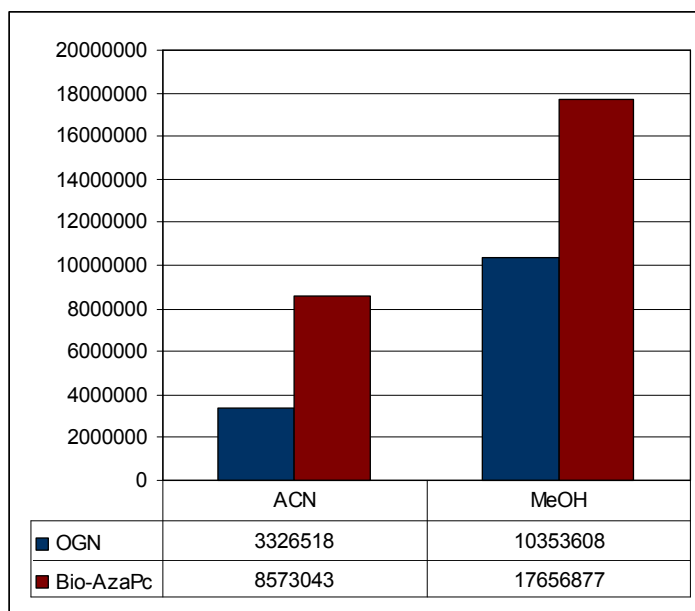
Při následném pokusu byl vyměněn acetonitril za methanol jako organická část promývacího a elučního roztoku [6, 10].

Zajímavé je porovnání ploch píků po eluci v ACN (55%, obrázek č. 16 A.) a MeOH (80%, obrázek č. 16 B.). V methanolu se pohyb vzorku po koloně výrazně zpomalil, změnila se tedy síla retence vzorku na sorbentu, a proto bylo třeba upravit obsah methanolu v promývacím (na 55 % MeOH) a elučním kroků (na 80 % MeOH). Závěrem této změny se dá říct, že výsledky plynoucí z obrázku č. 16 jasně ukazují, že použití MeOH jako promývacího a elučního roztoku je výrazně lepší z důvodu daleko vyšší výtěžnosti Bio-AzaPc, ale také především pro lepší čistotu hlavního píku vzorku na HPLC (viz chybějící znečištění fragmenty analytu na konci hlavního píku Bio-AzaPc u obrázku č. 16 B.).



Obrázek č. 16: Srovnání hlavních eluátů v 55% ACN (A.) a 80% MeOH (B.)

Z porovnání celkových množství integrovaných ploch píků z extrakce OGN a Bio-AzaPC v ACN (promývací + eluční roztoky) a zvlášt' v MeOH (promývací + eluční roztoky) na základě analýz HPLC je jasně patrný vyšší výtěžek v MeOH (uvedeno na obrázku č. 17) při použití stejných množství vzorku (100 μ l 100nmol).



Obrázek č. 17: Porovnání celkové plochy píků OGN a Bio-AzaPc v testu s ACN proti testu s MeOH

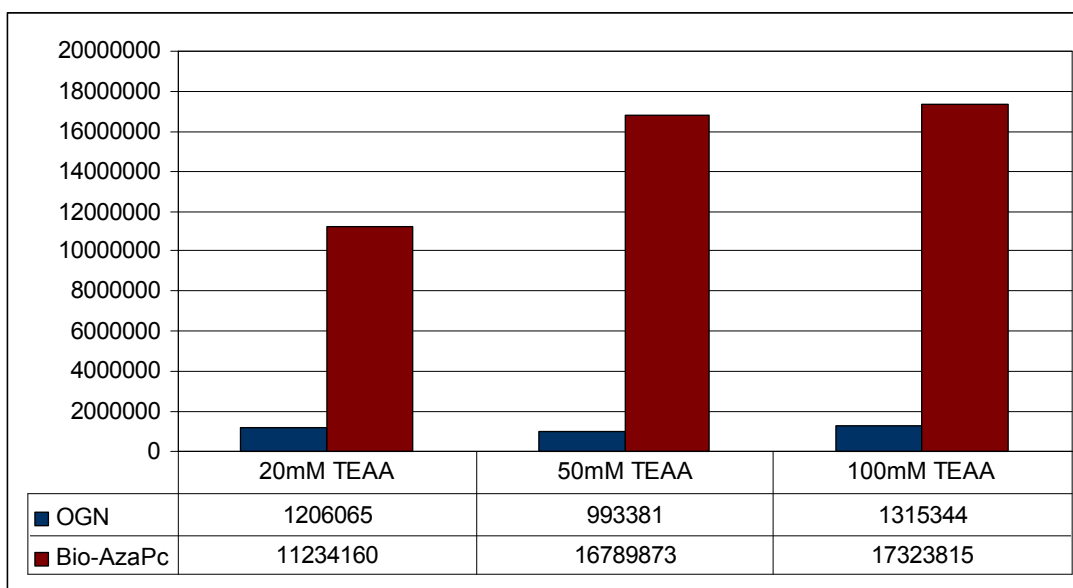
MeOH, změny kondicionačního postupu, molarity a pH pufru

Jako další směr purifikace Bio-AzaPc byly zkoušeny změny jednotlivých parametrů extrakce u MeOH (molarita, objemové množství, kondicionace, pH extrakčních roztoků) a jejich vliv na výtěžnost Bio-AzaPc.

Změna kondicionace ve smyslu snížení molarity pufru (na 20mM TEAA) vedla ke změně prostředí na kolonce natolik, že se výrazně zhoršila retence Bio-AzaPc. Zhoršení retence pak následně zhoršilo i čistotu separovaných Bio-AzaPc od oligonukleotidů. Použitím 20mM TEAA v kroku kondicionace se již při pohledu okem Bio-AzaPc v 65% MeOH neudržely a eluovaly se pryč z kolonky. Molarita měla tedy velký vliv na retenci Bio-AzaPc na kolonce.

Testy se snížením molarity pufru (na 20mM TEAA, jak v kondicionaci, tak i v promývacích roztocích), potvrdily snížení retence biokonjugátů azaftalocyaninů na fenylové kolonce. Bio-AzaPc se začaly eluovat v 65% MeOH, avšak hlavní množství Bio-AzaPc pak i v 80% a 90% eluátech spolu s oligonukleotidovými řetězci. Takže se díky nižší molaritě velmi výrazně rozšířilo rozmezí koncentrací elučních roztoků (zpomalil se také pohyb analytu po kolonce při elučních krocích). Bylo by tak velmi zbytečné eluované množství vzorku rozdělovat do více koncentrací (vyšší spotřeba rozpouštědla) a to bez zásadního vlivu na výsledné množství Bio-AzaPc.

Se změnou molarity pufru z 50mM na 100mM TEAA se retence oligonukleotidů na kolonce naopak o něco zvětšila. To znamenalo, že v 65% promývacím kroku se vymývalo menší množství OGN než v předešlých experimentech a v koncentracích 80% MeOH (eluát) se zase začlo objevovat o něco více oligonukleotidových řetězců. Tyto změny v molaritě pufru (100mM) sice ovlivnily retenci OGN a Bio-AzaPc na kolonce, ale bez podstatné změny na výsledném eluovaném množství Bio-AzaPc (obrázek č. 18). Naopak tím, že se celkové množství eluovaných vzorku OGN spíše zvětšilo, zhoršila se tak i čistota extrahovaných Bio-AzaPc (ve 100mM TEAA to bylo 92,4 % a v 50mM TEAA to činilo 93,8 %). Tato změna extrakce se tak zdála ve srovnání s 50mM TEAA pro purifikace biokonjugátů azaftalocyaninů skoro srovnatelná.



Obrázek č. 18: Srovnání ploch píků v 80% eluátech v různých molaritách pufru

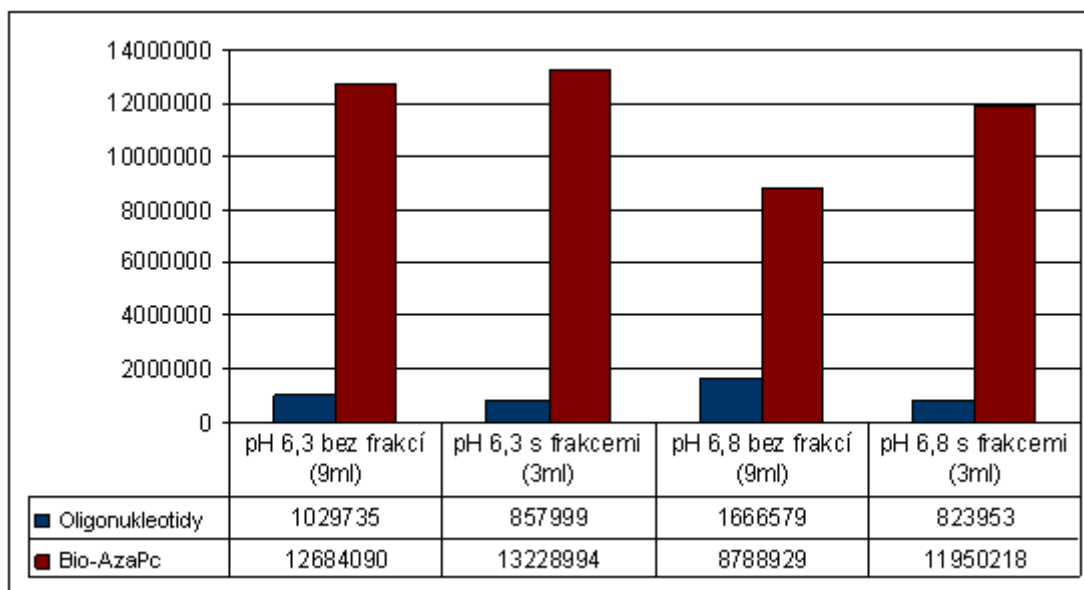
Se zvětšením objemových množství promývacích roztoků (z 3 ml na 6 ml) se jednak nepatrně zvýšilo promyté množství OGN v 55% roztoku, ale zároveň i množství vymytých Bio-AzaPc. Takže odstraněním většího počtu balastních látek (OGN) byla ovlivněna i výsledná ztráta Bio-AzaPc v 80% MeOH.

Snížení pH pufru (na 5,8) zapříčinilo i snížení retence vzorku na kolonce, a tudíž již v 65% MeOH se Bio-AzaPc eluovaly. Navíc HPLC analýza ukázala, že čistota hlavního píku v 80% MeOH byla výrazně horší než u metody s neupraveným pH.

Zvýšení pH na 6,8 a 7,4 nepřineslo výraznější změny směrem k vyšší eluci Bio-AzaPc v porovnání se standardním pH TEAA pufru 6,3, proto závěrem lze říct, že pro jednoduchost metody je snadnější provádět extrakci v nezměněném pH TEAA pufru (pH 6,3).

Na obrázku č. 19 jsou shrnuty výsledky experimentu při postupném promývání objemově menšími roztoky (3 x 3 ml) a v jednorázovém promytí větším objemem (9 ml), navíc v porovnání v pH pufru 6,3 a 6,8. Při pH 6,3 v 80% eluátu se elovalo větší množství Bio-AzaPc než při pH 6,8, u kterého se zase v promývacím kroku odstranilo výrazně větší množství oligonukleotidů. Tento pokus tak potvrdil, že zvýšení pH by nepřineslo žádaný efekt na vyšší výtěžnost Bio-AzaPc. Výsledky integrací ploch píků z HPLC analýz (obrázek č. 19) vypovídají, že rozdíly nejsou jinak zvlášť

markantní. Dá se tak předpokládat, že pH pufru nemá podstatný vliv na extrakční výtěžek Bio-AzaPc pomocí metody SPE.



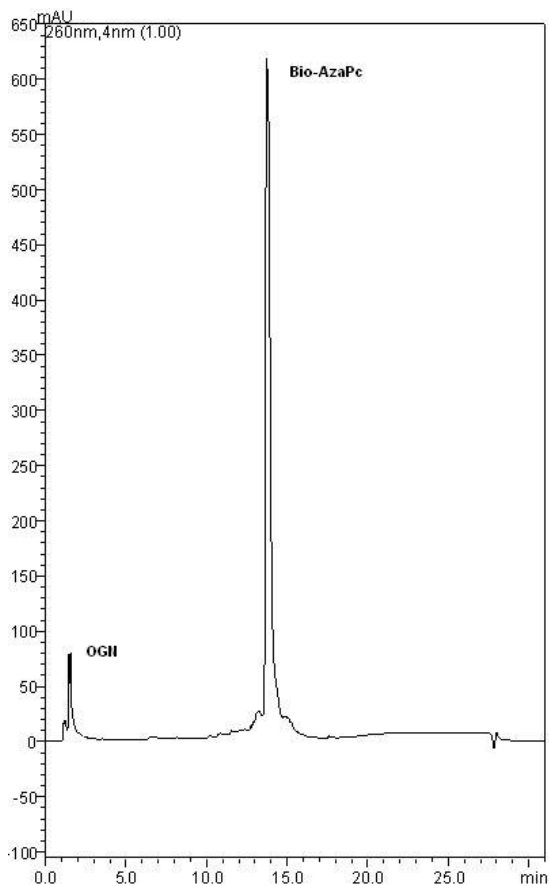
Obrázek č. 19: Porovnání ploch píku Bio-AzaPc a oligonukleotidových řetězců v pH pufru 6,3 a 6,8 (80% MeOH eluáty)

Pokusy ukázaly, že výhodněji vychází opakované promývání menšími objemy elučního činidla než jednorázové promytí větším objemem MeOH. Nicméně rozdíly v pH 6,3 nebyly nijak zásadní. Proto pro jednoduchost provedení je lepší jednorázové promytí kolonky 9 ml promývacího roztoku.

Zdá se tedy, že i množství elučního roztoku nemá nijak zásadní vliv na výslednou velikost eluovaných Bio-AzaPc a olig. řetězců.

Velmi zajímavé bylo, že jak změny pH, tak i objemová množství nemají žádný vliv na výskyt zbytkových množství OGN v 80% MeOH. Neustále ve všech testech zůstávalo v 80% eluátech od 5-15 % OGN v porovnání k Bio-AzaPc.

Vliv znečištění extrakční dráhy manifoldu oligonukleotidovými řetězci byl zanedbatelný, neboť jak ukazuje obrázek č. 20, jak čistota, tak i velikost ploch píku byla srovnatelná s pokusy bez této úpravy metody. Znečištění 80% eluátu oligonukleotidovými zbytky bylo přibližně 10 %



Obrázek č. 20: 80 % eluát, přehození kolonky před elucí do čisté extrakční dráhy manifoldu

Pokusy se záměnou pufru za čistěnou vodu potvrdily nezbytnost pufru (TEAA) jako složky, která zaručuje funkčnost celého procesu. Jeho význam byl v udržení určitého prostředí na kolonce, bez kterého nedochází k dostatečné aktivaci sorbentu pro jeho interakce se vzorkem. Jednotlivé pokusy ukázaly, že již v nízkých (10%) koncentracích (promývací krok) MeOH docházelo k úniku Bio-AzaPc z kolonky. Bio-AzaPc v tomto případě nevykazovaly žádnou retenci na fenylovou kolonku. Proto lze tento krok purifikace metody označit za nefunkční.

Reprodukovatelnost metody

Reprodukovatelnost metody vyšla následovně: dva ze tří pokusů vyšly relativně shodně oproti jednomu pokusu s menším množstvím Bio-AzaPc v 80% MeOH a s celkově méně oligonukleotidy (tabulka č. 4). Přesto výsledné hodnoty vzhledem k procentuálnímu zastoupení poměru volných olig. řetězců a Bio-AzaPc nebyly výrazně odlišné od jiných pokusů (okolo 5-15% u předchozích pokusů). Při nastavení stejných podmínek lze metodu poměrně snadno reprodukovat.

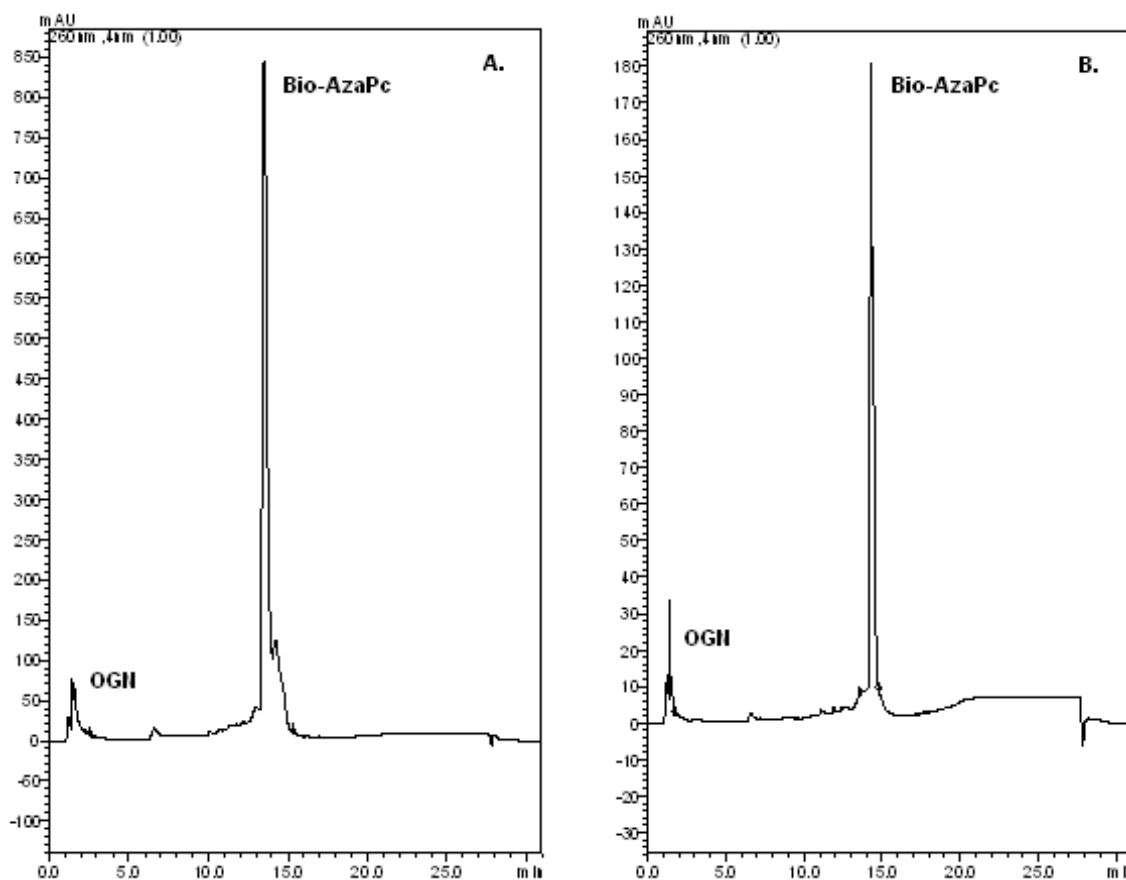
Tabulka č. 4: Srovnání 3 testů na reprodukovatelnost metody

80% eluát MeOH	I.	II.	III.
Oligonukleotidy	505512	816444	214924
Bio-AzaPc	11047947	10024612	5843120
procentuální poměr olig. : AzaPc	12,00 %	11,21 %	16,16 %

Aplikace metody na G6 a J6 vzorky

Experimenty s delšími (G6, 29 bází) a kratšími (J6, 20 bází) biokonjugáty AzaPc vyšly s rozdílnými výsledky. U vzorku G6 se v 55% MeOH Bio-AzaPc ještě neuvolňovaly z kolonky, což svědčí o srovnatelných retenčních schopnostech jako u standardních Q21 Bio-AzaPc. V 80% roztoku se eluovalo velké množství Bio-AzaPc (obrázek č. 21 A.), přičemž bylo toto množství plně srovnatelné s Q21. Pro G6 řetězce tedy dosavadní metoda SPE bez problémů fungovala.

U vzorků J6 (obrázek č. 21 B.) se Bio-AzaPc a oligonukleotidové řetězce eluovaly mnohem méně než u G6. Odpovídá to výrazně vyšší afinitě vzorku ke stacionární fázi, která může být zapříčiněna vyšší hydrofobicitou Bio-AzaPc s kratším oligonukleotidovým řetězcem. Tudíž pro analyty tohoto typu se dosavadní metoda nehodí. Metoda by nejspíš i u těchto řetězců fungovala po úpravách promývacího roztoku (zvýšení procentuálního obsahu MeOH v promývacím a eluční kroku) nebo použitím méně polárního rozpouštědla.



Obrázek č. 21: A. 80% eluát vzorků G6

B. 80% eluát vzorku J6

Výtěžnost metody

Po odpaření byly SPE eluáty z 80% MeOH porovnány s neextrahovaným vzorkem (100 µl vzorek byl rozpuštěný v 3 ml 80% MeOH a následně byl také odpařen). Pro srovnání byly ještě výsledky porovnávány se vzorkem (extrahovaný stejným způsobem) uloženém 1 měsíc v lednici.

Dva nástřiky dvou extrahovaných vzorků na HPLC ve srovnání se svými porovnávacími roztoky (před extrakcí) přinesly relativně shodné výsledky výtěžnosti. Jak plyne z tabulky č. 5 a obrázku č. 22, výtěžnost byla okolo 70-75 %. Na obrázku č. 22 je také jasně patrné, že i když 80% eluát stále zůstával znečištěn určitým množstvím OGN, pomocí SPE dochází k výraznému přečištění Bio-AzaPc od balastních oligonukleotidových řetězců.

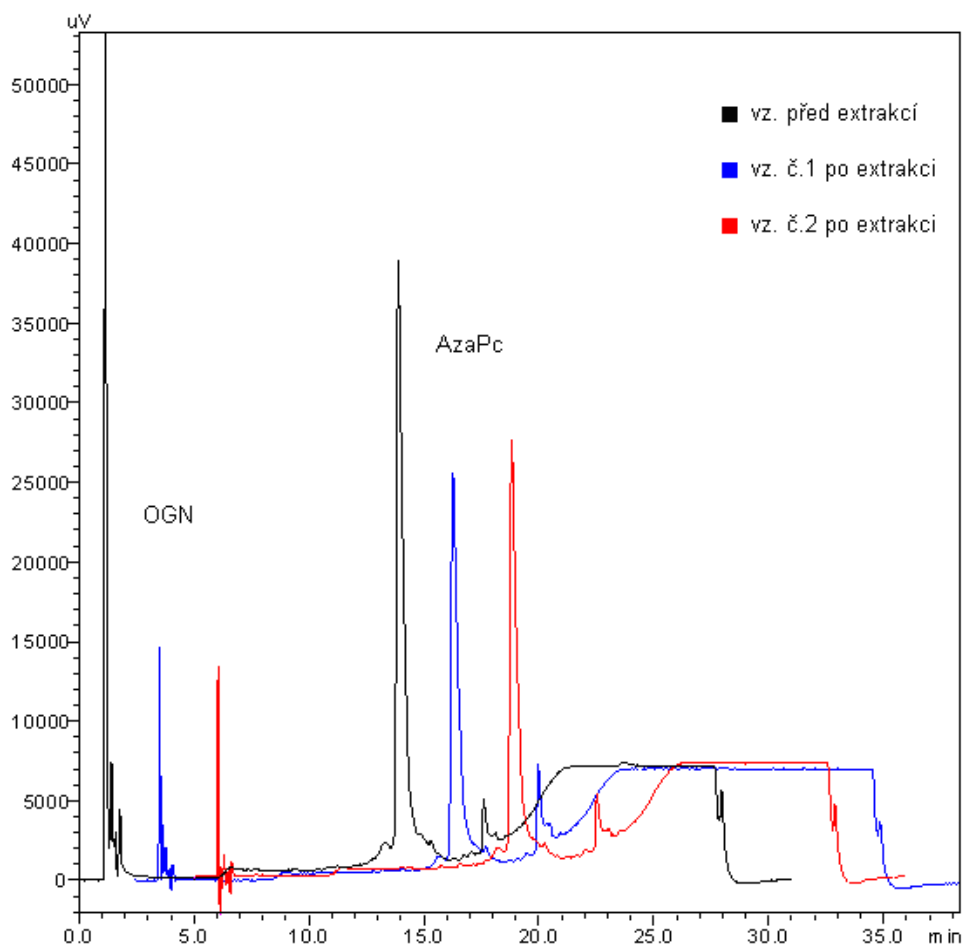
Výtěžnost extrakce vzorku po jednom měsíci v mrazničce (viz tabulka č. 6), s následným porovnáním se vzorkem uskladněným stejným způsobem 1 den, se výrazně změnila. Byla asi 52 %, což ve srovnání s přibližně 73 % u extrakce po 1 dni zmražení je překvapující. Delší skladování při teplotách -18 až -20 °C, tedy může mít vliv na stabilitu vzorku, neboť docházelo ve vzorku k poklesu obsahu Bio-AzaPc cca o 30 %.

Tabulka č. 5: Shrnutí testů na výtěžnost metody po integraci ploch píků Bio-AzaPc

Extrakce nově syntetizovaný vzorků A			
	1. nástřik	2. nástřik	Ø
Vzorek bez extrakce (kontrolní)	865413	867465	866439,0
Vzorek č. 1 po extrakci	600166	642501	621333,5
Vzorek č. 2 po extrakci	629504	654168	641836,0
č. 1 %	69,35	74,07	71,7
č. 2 %	72,74	75,41	74,1

Tabulka č. 6: Shrnutí testů na výtěžnost metody (po zmražení) po integraci ploch píků Bio-AzaPc

Extrakce vzorků po zmražení			
	Vzorek A (po 1 dnu v mrazničce)		Vzorek B (po 1 měsíci v mrazničce)
	1. nástřik	2. nástřik	1. nástřik
Vzorek bez extrakce (kontrolní)	890883	910325	981490
Vzorek č. 1 po extrakci	658108	678713	519924
Vzorek č. 2 po extrakci	646017	672165	
č. 1 %	73,87	74,56	52,97
č. 2 %	72,51	73,84	



Obrázek č. 21: Záznamy vzorků při 260 nm - výtěžnost

I přes snahu odstranit i zbytková množství analytu (kolonky zůstávaly neustále částečně slabě zbarveny), Bio-AzaPc zůstávaly na kolonce i po promytí silnými organickými rozpouštědly v jejich kombinaci s pufrem (jako například tetrahydrofuran či dichlormethan, atd.). Z výtěžnosti metody plyne, že zbylých cca 25-30 % Bio-AzaPc na kolonce pravděpodobně stále zůstávalo. Zbytkové zbarvení kolonky mohlo být způsobeno jak neeluovanými biokonjugáty azaftalocyaninů (Bio-AzaPc), volnými AzaPc bez oligonukleotidových řetězců (nevázané AzaPc), tak i zbytkovými fragmenty Bio-AzaPc.

Kapacita fenylového sorbentu

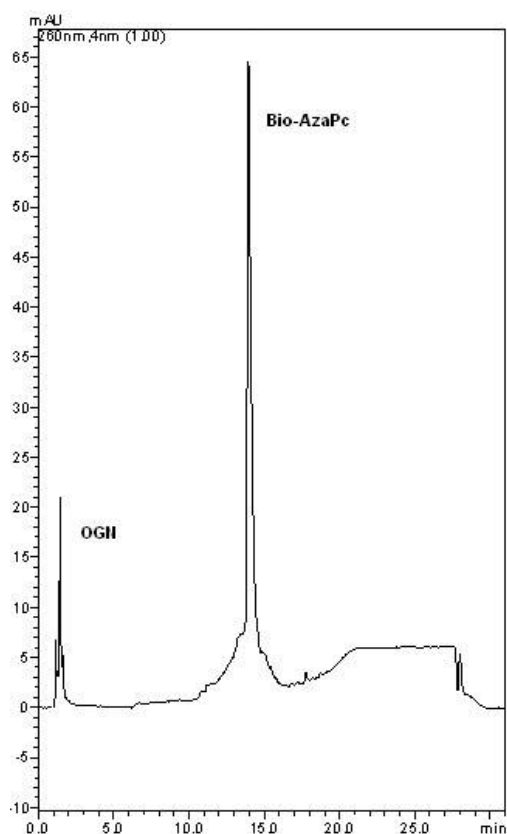
Test na kapacitu kolonky poukázal na to, že 400 μl 100nM vzorku bylo větší množství než kolonka při jednorázovém nanesení dokázala „unést“, neboť část vzorku se již při pohledu okem neudržela na kolonce a v promývacím kroku 55% MeOH se eluovala (asi 1/5 vzorku). Lze říct, že kapacita fenylové kolonky DSC-Ph 500 mg/3 ml se nachází okolo 300 μl 100nM analytu. Větší množství se již neadsorbuje na stacionární fázi a promývá se již v promývacím kroku pryč z kolonky. Vzhledem k nedostatku většího množství vzorku jsme nemohli provést další pokusy a zjistit přesnější kapacitu fenylové kolonky pro analyt Q21. Otázkou pro další práce může být i opakované nanášení vzorku, jako je tomu u OPC kolonek, a jeho vliv pro dokonalejší adsorpci většího množství analytu.

Použití jiných SPE kolonek

Původně byly testovány Bio-AzaPc na kolonkách DSC-18, 18Lt, DSC-8 a DSC-Ph. Pro lepší představivost se vyzkoušelo chování Bio-AzaPc i na jiných SPE kolonkách:

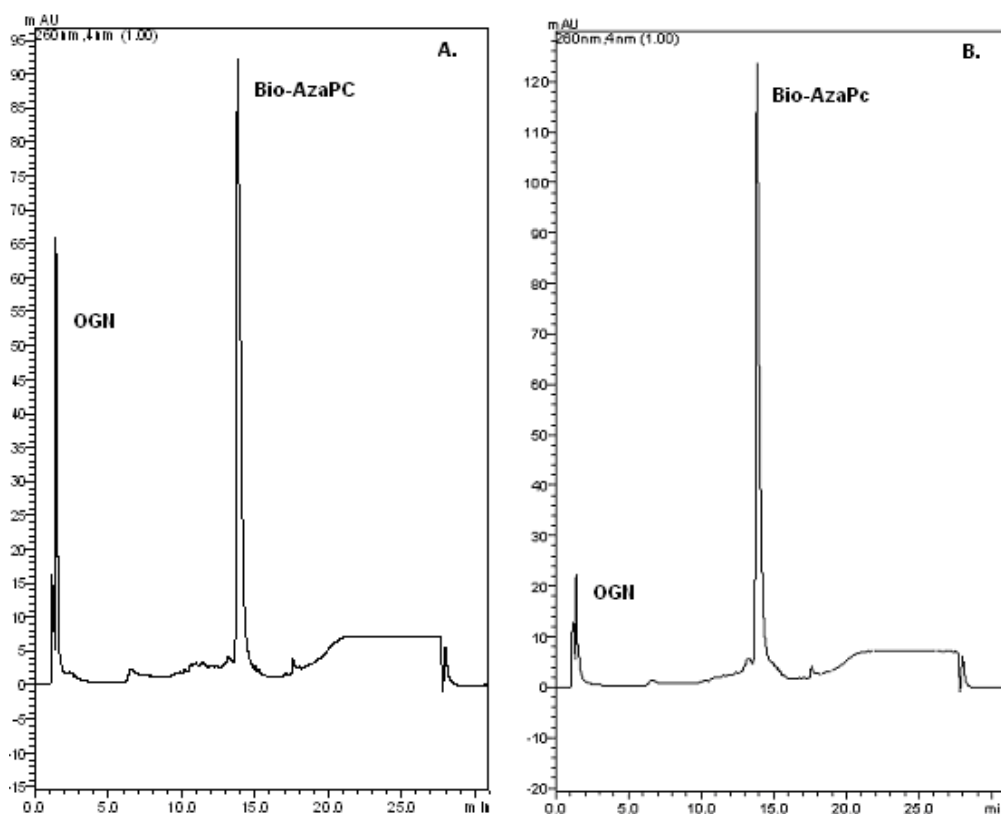
- Chromabond C₄ od firmy Macherey-Nagel
- DSC-8 od firmy Supleco
- STRATA-X kolonka a STRATA Phenyl od firmy Phenomenex
- HyperSep Phenyl 100PK od firmy ThermoScientific

Vzorek se choval na C-4 kolonce jako na její fenylové obdobě. Kolonka se po extrakci zdála čistší. Mohlo to avšak být i díky menšímu množství naneseného vzorku ($1/5 = 20 \mu\text{l}$, jelikož kolonka měla jiné parametry 100 mg/1 ml). Při pohledu okem se stejně jako na DSC-Ph kolonce Bio-AzaPc uvolňovaly v 80% MeOH. Jedinou výjimkou bylo, že výsledný výtěžek Bio-AzaPc byl v přepočtu na množství naneseného vzorku o polovinu menší než na fenylové kolonce. (obrázek č. 23).



Obrázek č. 23: Eluát 80% MeOH na koloně C4

Jelikož z předchozích experimentů bylo jasné, že vzorek Q21 nejspíše měl na kolonce C-8 výrazně vyšší retenci než na fenylové kolonce, zkusilo se u C-8 kolonky dát čišťenou vodu místo pufru do vodné fáze extrakčních roztoků. Kondicionace byla kvůli aktivaci kolonky provedena v 50mM TEAA. Pro začátek jsme jako promývací roztok nastavili již 20% MeOH. Při klasické kondicionaci se pak v 40% MeOH uvolňovaly Bio-AzaPc, ale ve výsledku byl v tomto eluátu obsah Bio-AzaPc menší než u klasické fenylové kolonky (obrázek č. 24 A.), navíc se zde vyskytoval velký pík oligonukleotidového řetězce. Docházelo tak na této kolonce k nedostatečnému přečištění Bio-AzaPc od OGN. V dalším pokusu s 15% MeOH v kondicionaci sice také docházelo k uvolnění Bio-AzaPc z kolonky, ve srovnání s fenylovou kolonkou vyšly tyto pokusy hůře, neboť výsledné hodnoty ploch píků Bio-AzaPc v 80% MeOH byly opět výrazně nižší než u fenylové kolonky (obrázek č. 24 B.).



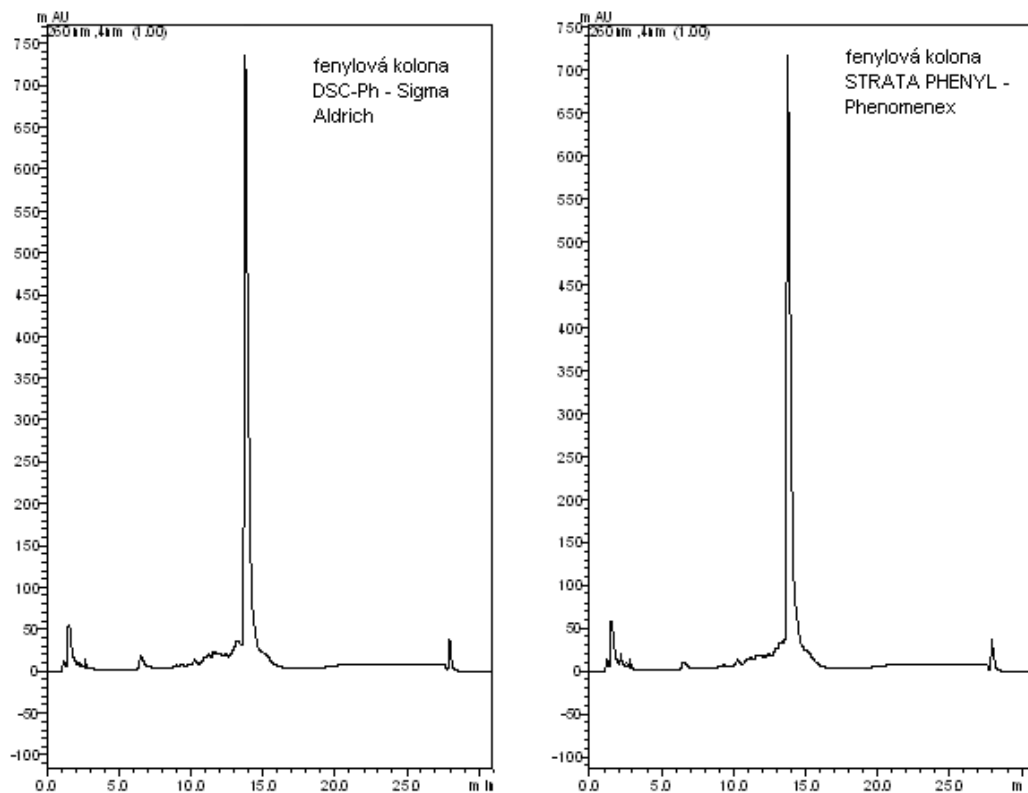
Obrázek č. 24: A. 40% MeOH/voda (jako vodní fáze roztoků) na C-8, B. Eluát 80% MeOH/50mM TEAA na C-8 (15% MeOH v kondicionace)

Extrakce Bio-AzaPc Q21 byla vyzkoušena i na kolonce STRATA-X 33 μ Polymeric reverse 500 mg/3 ml Sample. Jako první promývací krok se nastavil 10% MeOH, přesto

již v této koncentraci docházelo k vymytí vzorku Bio-AzaPc, a tudíž retence vzorku na tuto kolonku byla malá.

Porovnání fenylových kolonek od jiných výrobců

Pro porovnání se provedlo srovnání výsledků extrakce na fenylových kolonkách i od jiných výrobců: Phenomenex - STRATA PHENYL (500 mg/3 ml) a ThermoScientific - HyperSep Phenyl 100 mg/1 ml 100 PK. Obrázek č. 25 ukazuje porovnání fenylových kolonek od Phenomenexu s kolonkou od Supelco (standard). Obě kolonky mají stejný objem množství sorbentové náplně. Ve výsledku bylo zřejmé, že kolonka od firmy Phenomenex je plně srovnatelná s kolonkou Supelco. Naopak extrakce kolonkou Phenyl 100 mg/1 ml od ThermoScientific vůbec nevyšla. Po nanesení 20 μ l (1/5) se vzorek částečně eluoval již v 55% MeOH a částečně v 80% MeOH a navíc kolonka nadále zůstávala zbarvená i po promytí silnějšími rozpouštědly (THF). Je zřejmé, že ačkoliv obsah sorbentů na kolonce od ThermoScientific byl 1/5 oproti standardní kolonce DSC-Ph složení sorbentů se může lišit natolik, že to významně ovlivní retenci vzorku na sorbentu.



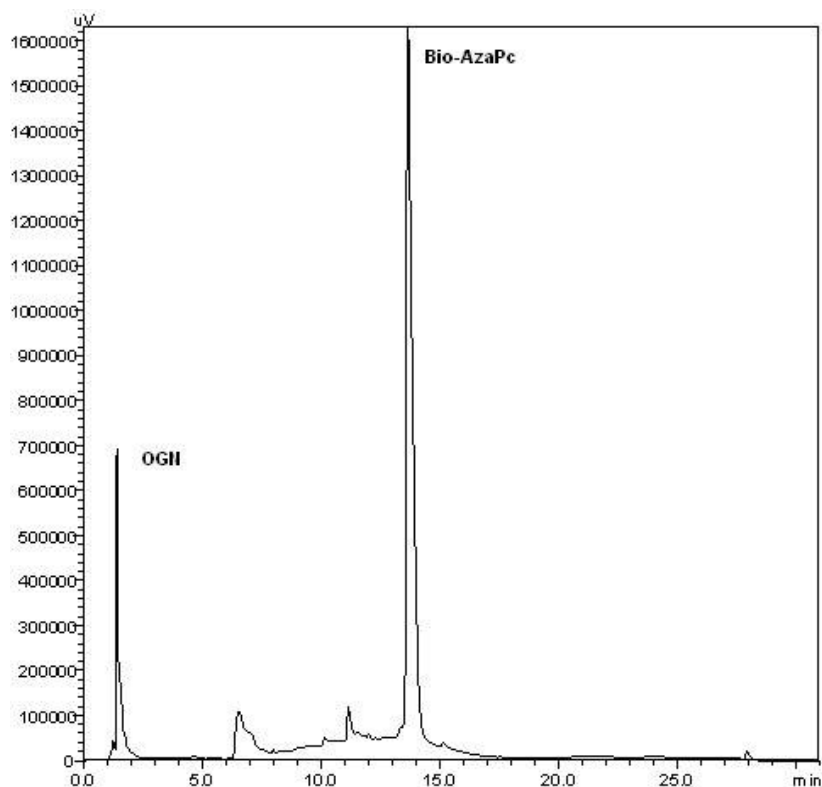
Obrázek č. 25: Srovnání záznamů na HPLC od dvou výrobců (kolonky – 500 mg/3 ml)

Semipreparativní stanovení AzaPc

Pro porovnání výtěžnosti metodiky SPE byla provedena extrakce vzorku pomocí HPLC na semipreparativní koloně [9].

Pomocí této kolony se sbírala frakce, ve které se eluovaly Bio-AzaPc od 12 min do 15 min po jejich průchodu semipreparativní kolonou. Ta se následně odpařila na odpařovacím přístroji a po opětovném rozpuštění ve 130 μ ml vody (množství vody, ve kterém byly na HPLC analyzovány i jiné vzorky po jejich odpaření) se frakce analyzovala na HPLC.

Výsledný záznam na HPLC však ukázal i výskyt významného množství oligonukleotidových řetězců (pík v 1-2,5 min., viz obrázek č. 26).



Obrázek č. 26: Semipreparativní stanovení AzaPc na HPLC

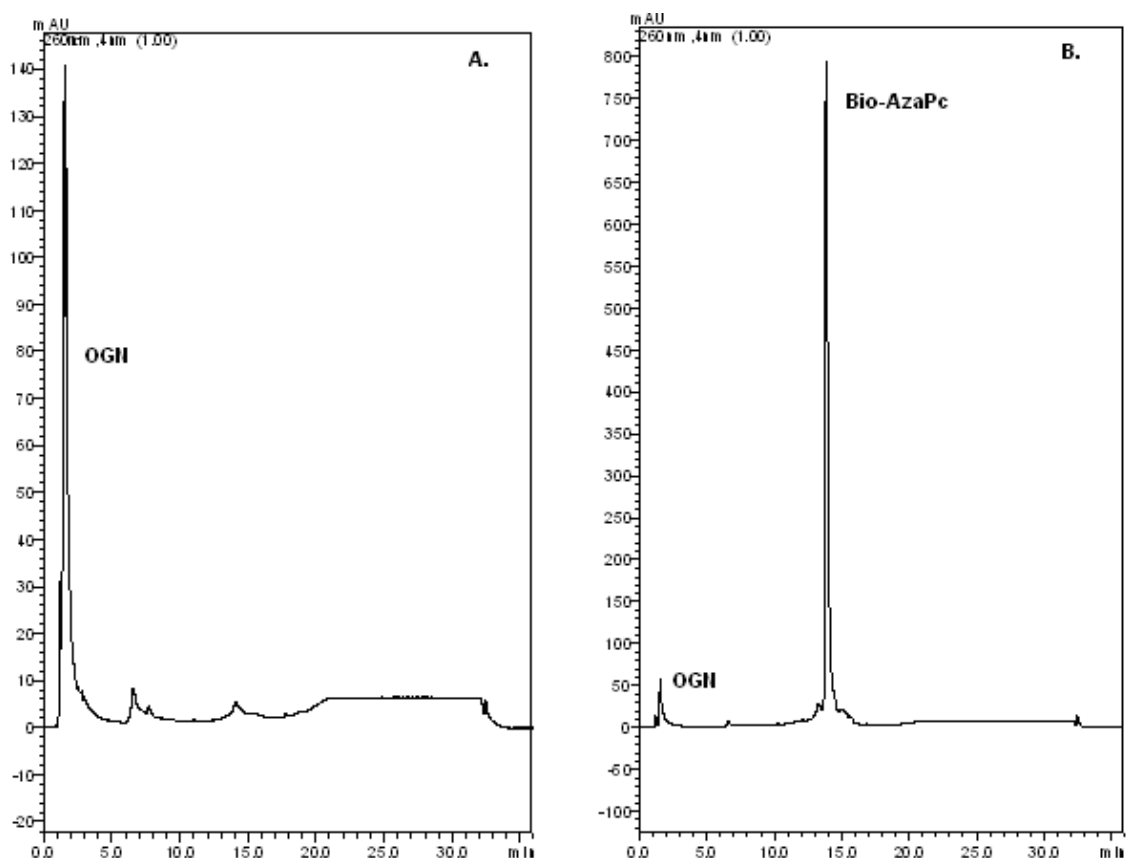
Za předpokladu, že byl pokus proveden bez chyby a vyloučíme-li i přístrojovou chybu, otázkou zůstává, co může natolik ovlivnit výsledky, že i přesto dochází k výskytu volných oligonukleotidových řetězců v čisté frakci Bio-AzaPc. Rozumné vysvětlení může být v procesu odpařování eluovaných roztoků na odpařovacím přístroji. Odpařovací krok by se dal nahradit například lyofilizací. Nakolik však tento proces ovlivňuje stabilitu vzorku (a tím i tvorbu štěpných fragmentů oligonukleotidů), nelze ze

zjištěných výsledků s jistotou říci. Musela by se provést další studie zaměřená na vliv odpaření na stabilitu vzorku Bio-AzaPc.

Optimální SPE metoda pro čištění Bio-AzaPc

Jako kondicionační podmínky pro 500 mg fenylovou kolonku DSC-Ph (která na základě chemické povahy vzorku, i zjištěných výsledků byla neoptimálnější) byly určeny 3 ml 100% MeOH a 5 ml 50mM TEAA

Obrázek č. 27 ukazuje chromatogramy výsledných promývacích a elučních roztoků pro OGN a Bio-AzaPc. Promývací roztok 55% MeOH/50mM TEAA (viz obrázek č. 27 A.) je pak dostatečná síla roztoku pro odstranění většiny balastních látek (OGN, 1-3,5 min) bez ztráty biokonjugátů azaftalocyaninů. Eluční roztok 80% MeOH/50mM TEAA (viz obrázek č. 27 B., 12,5-16 min) je naopak ideální pro jejich eluci.



Obrázek č. 27: Výsledné HPLC záznamy extrakčních roztoků 55% MeOH (A.) a 80% MeOH (B.)

6. Závěr

Optimální metoda SPE (na základě zjištěných výsledků) pro Bio-AzaPc pomocí fenylové kolonky DSC-Ph (500 mg/3 ml) od firmy Supelco:

- Kondicionace: 3 ml 100% MeOH + 5 ml 50mM TEAA
- Nanesení vzorku: 100 µl 100nM
- Promývací roztok: 9 ml 55% MeOH/50mM TEAA
- Eluční roztok: 3 ml 80% MeOH/50mM TEAA

Na základě získaných hodnot v této práci bylo zjištěno, že pro Bio-AzaPc je ideálnější jako organická část extrakčních roztoků MeOH než ACN. Tento hlavní poznatek z výsledků práce určuje jednak lepší čistota extrahovaných Bio-AzaPc, tak i vyšší celkové množství extrahovaných Bio-AzaPc v MeOH.

Jak změny pH pufru, tak jeho molarity v zásadě nepřinesly žádané změny ve výtěžnosti či čistotě Bio-AzaPc oproti prvotním experimentům. Pro jednoduchost SPE purifikace Bio-AzaPc je lepší do pH TEAA pufru nezasahovat, naopak molarita TEAA pufru by měla být alespoň 50mM.

Přestože bylo snahou odstranit veškeré zbytky oligonukleotidů v 80% elučním roztoku MeOH, nepodařilo se to. Otázkou pro další práce zůstává, zda kroky odpaření a zmražení roztoků mají natolik podstatné důsledky, že dokáží výsledné hodnoty ovlivnit v takové míře. Naměřené výsledky výtěžnosti se vzhledem k počtu dalších kroků, kterými analyt do analýzy na HPLC prochází, a které tak mohou mít vliv na výsledné hodnoty (odpaření, znovurozpuštění, časová prodleva), dají označit za dobré. Výtěžnost metody byla okolo 70-75 %. Hlavní ztráta ve výtěžnosti pravděpodobně vzniká v neschopnosti odstranit i zbytkové množství Bio-AzaPc na SPE kolonce (zbytkové zabarvení). Jak již bylo zmíněno výše, oligonukleotidové znečištění ve výsledném 80% eluátu se pohybuje okolo 5-15 %. Otázka obsahu oligonukleotidů ve výsledných eluátech může souviset se stabilitou biokonjugátů během odpařování analytu od rozpouštědla či delšího skladování (>1 měsíc) při nízkých teplotách (-20 °C). Podle výsledků tak docházelo při měsíčním skladování k poklesu obsahu extrahovaných Bio-AzaPc cca o 30 %.

Vyvinutou SPE metodu lze označit jako snadno reprodukovatelnou a pro svou jednoduchost i snadno proveditelnou, a tudíž ji lze brát jako určitou alternativu k již vyvinuté metodě purifikace Bio-AzaPc podle KAMINSKÉ M. [9].

Použitá literatura

1. ZIMČÍK P. a kol.: Azaftalocyaniny jako zhášedce fluorescence typu „dark quencher“. *Chem. Listy* 102, 2008, s. 1021 – 1083
2. ZIMČÍK P. a kol.: Azaftalocyaniny – od syntéz přes fotochemické a fotofyzikální vlastnosti k aplikacím, *Chem. Listy* 104, 2010, s. 1065–1133
3. KOPECKÝ K. a kol.: Účinnost zhášení fluorescence novým strukturním typem zhášedců ze skupiny azaftalocyaninů. *Chem. Listy* 102, 2008, s. 1021 – 1083
4. KOPECKÝ K. a kol.: Synthesis of new azaphthalocyanine dark quencher and evaluation of its quenching efficiency with different fluorophores. *Tetrahedron* 67, 2011, s. 5956-5963
5. KOPECKÝ K. a kol.: Solid-Phase Synthesis of Azaphthalocyanine-Oligonucleotide Conjugates and Their Evaluation As New Dark Quenchers of Fluorescence. *Bioconj. Chem.* 21, 2010, s. 1872–1879
6. HORN T. a kol.: Solid supported hydrolysis of apurinic sites in synthetic oligonucleotides for rapid and efficient purification on reverse-phase cartridges. *Nucl. Acid. R.* 16, 1988
7. *Oligo Purification*, Gene Link Inc. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://www.genelink.com/Literature/ps/oligopurification-cat.pdf>>
8. *Oligonucleotide Purification*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-15], dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/1/oligonucleotide-purification-guidelines.Par.0001.File.tmp/oligonucleotide-purification-guidelines.pdf>
9. KAMINSKÁ M.: *Využití HPLC pro separaci biokonjugátů azaftalocyaninů*. Univerzita Karlova, Fakulta Farmaceutická, Hradec Králové, Diplomová práce 2010
10. THURMAN E. M.: *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. New York, Wiley-Interscience, 1998
11. *Extrakce tuhou fází*, Sigma-Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>>
12. HENNION M. - C.: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatography A.* 856, 1999, s. 3–10
13. *Guide to Solid Phase Extraction*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t197910.Par.0001.File.tmp/t197910.pdf>>
14. NOVÁKOVÁ L., VLČKOVÁ H.: A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *A. Chim. Acta* 656, 2009, s. 8-35

-
15. *Separáční metody KATA*, Přírodovědecká fakulta UK. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://web.natur.cuni.cz/~suchan/extrakce.pdf>>
 16. *SPE kolonky*, Labicom s.r.o., obrázek upraven. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.labicom.cz/spe-kolonky-81/>>
 17. *Overview of SPE Technology/Metod Development New Trends in Sample Preparation*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-03], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Posters/1/t407048h.Par.0001.File.tmp/t407048h.pdf>>
 18. *Supelco Solid Phase Extraction Products*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/General_Information/t402150.Par.0001.File.tmp/t402150.pdf>
 19. *Learning center*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/learning-center.html>>
 20. POOLE C. F.: New trends in solid-phase extraction. *T. Analytic. Chem.* 22, 2003, s. 362-373
 21. *SPE & Filtration – Selection Information*, W. R. Grace & Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <http://www.discoverysciences.com/uploadedFiles/Home/SPE_Filtration_SelectionInfo_p296to301.pdf>
 22. *Empty SPE Cartridges*, Crawford Scientific Ltd., obrázek. [online] 2012 [cit. 2012-01-10], dostupné z <http://www.crawfordscientific.com/Silicycle_SPE_EmptySPE.htm>
 23. *Overview*, Sigma Aldrich Co., obrázek. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/learning-center/spe-overview.html>>
 24. *Solid Phase Extraction (SPE)*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9642731>>
 25. *SPE products*, Phenomenex Inc. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.phenomenex.com/Products/Search/SPE>>
 26. *Solid Phase Extraction Products*, ThermoScientific Inc. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <http://www.thermoscientific.com/ecomm/servlet/productscatalog_11152_10507_96066_-1_4>
 27. *Sample Preparation*, CNW Tech. GmbH. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.cnwtech.eu/download/Catalogue-SPE.pdf>>

-
28. *Florisil® for Column Chromatography*, Material Harvest Ltd. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <http://www.materialharvest.com/welcome/silica_products/florisil_chromatology.html>
 29. *Sample Preparation*, Agilent Technologies. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.chem.agilent.com/EN-US/PRODUCTS/COLUMNS-SUPPLIES/SAMPLEPREPARATION/Pages/default.aspx>>
 30. *SPE & Filtration*, W. R. Grace & Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-11], dostupné z <<http://www.discoverysciences.com>>
 31. *HybridSPE-Phospholipid*, Sigma Aldrich Co., obrázek. [online] 2012 [cit. 2012-01-04], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/hybridspe-ppt.html>>
 32. KUČERA R a kol. Utilization of zirconia stationary phase as a tool in drug kontrol. *J. Sep. Sci.* 28, 2005, s. 1307-14
 33. *Molecular imprinting*, Satanaka-en.wikipedie, obrázek upraven. [online] 2012 [cit. 2012-01-12], dostupné z <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Molecular_imprinting.png>
 34. PUOCI F. a kol.: New restricted access materials combined to molecularly imprinted polymers for selective recognition/release in water media. *Eur. Polymer J.* 45, 2009, s. 1634–1640
 35. *Introducing Thermo Scientific SOLA products*, ThermoScientific Inc. [online] 2012 [cit. 2012-02-05], dostupné z <<http://www.thermoscientific.com/ecom/servlet/newsdetail?storeId=11152&contentId=54068&ca=sola-spe>>
 36. *Thermo Fisher Scientific Launches Revolutionary Fritless SPE Technology*, ThermoScientific Inc. [online] 2012 [cit. 2012-02-05], dostupné z <[http://www.eurobiotechnews.eu/new-products/immunochemicals/productdetail/?tx_ttnews\[tt_news\]=14073&tx_ttnews\[backPid\]=51&cHash=9ad8980189](http://www.eurobiotechnews.eu/new-products/immunochemicals/productdetail/?tx_ttnews[tt_news]=14073&tx_ttnews[backPid]=51&cHash=9ad8980189)>
 37. BRULÍK J.: *Využití techniky mikroextrakce tuhou fází (SPME) pro analytickou extrakci perzistentních organických polutantů*, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká Fakulta, Brno, Bakalářská práce, 2006
 38. *Solid Phase Microextraction*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-06], dostupné z <<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spme.html>>
 39. *Optimalizace výběru vhodného SPME vlákna*, Sigma Aldrich Co. [online] 2012 [cit. 2012-01-06], dostupné z <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma-Aldrich/General_Information/sep3.Par.0001.File.tmp/sep3.pdf>

-
40. SPME, Lambda Life a.s. [online] 2012 [cit. 2012-01-06], dostupné z <<http://www.lambda.sk/pdf/metodiky/SPME.pdf>>
 41. PROKEŠ R.: *Využití pasivních vzorkovačů pro měření kontaminace povrchových vod*, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká Fakulta, Brno Diplomová práce, 2006
 42. CHASSAING CH., ROBINSON S.: Turbulent Flow Chromatography: an Evolving Solution for Bioanalysis. *Chromatogr. Today*, 2009, s. 20-24
 43. CHEN Y. a kol.: Sample preparation. *J. Chromatogr. A. 1184*, 2009, s. 191-219
 44. SNYDER L. R. a kol.: *Practical HPLC Method Development*. 2. vyd., New York, Wiley-Interscience, 1997
 45. KLIMEŠ J. a kol.: *Kontrola léčiv I*. Praha, Karolinum, 2008