

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra analytické chemie

**Extrakce na tuhou fázi a její miniaturizace  
metodou Lab-On-Valve pro stanovení  
farmaceuticky významných látek**

Diplomová práce

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

**Hradec Králové, 2012**

**Iva Jelínková**

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. 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.“

15. 5. 2012

Ráda bych poděkovala PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za cenné rady, připomínky a ochotu při vypracování mé diplomové práce.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Iva Jelínková

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Název diplomové práce: Extrakce na tuhou fázi a její miniaturizace metodou Lab-On-Valve pro stanovení farmaceuticky významných látek

Diplomová práce se zabývá vývojem metody extrakce na tuhou fázi (SPE) s využitím mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS) pro stanovení vitamínů A, D, E a možnostmi automatizace této metody. Stanovení bylo založeno na absorpci vitamínů na mikrokoloně MEPS, rušivé složky byly odstraněny promývacím roztokem (zředěná kyselina octová o pH 3) a byla provedena extrakce elučním roztokem (100% ACN). Detekce proběhla za pomoci UV spektrofotometru při vlnových délkách absorpčních maxim pro vitamín A – 325 nm, pro vitamín D – 265 nm, pro vitamín E – 295 nm.

Metoda byla optimalizována. Byl vyvíjen program, kde byly testovány koncentrace jednotlivých vitamínů, dávkovací objemy, průtokové rychlosti a složení rozpouštědel.

Po optimalizaci metody byla provedena extrakce a následné stanovení krevní plazmy fortifikované vitamíny A, D, E metodou sekvenční injekční chromatografie (SIC). Výtěžnost metody byla pro vitamín A 156,83 %, pro vitamín D 28,38 %, pro vitamín E 15,79 %. Byla hodnocena opakovatelnost, pro kterou byly použity tři nástříky vitamínů A, D, E. Výsledky byly získány za použití nízkých koncentrací vitamínů. Nevýhodou metody byla nízká opakovatelnost a špatná reprodukovatelnost. Pro zlepšení reprodukovatelnosti a efektivnosti je nutný další vývoj.

# ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Iva Jelínková

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of diploma thesis: Solid-phase extraction and its miniaturization by method Lab-On-Valve for determination of pharmaceutical substances

This thesis deals with the development of the solid-phase extraction (SPE) method with the use of microextraction by packed sorbent (MEPS) for the determination of vitamins A, D, E and the possibility to automate this method. The determination was based on absorption of vitamins on microcolumn MEPS, interfering components were removed by washing solution (dilute acetic acid of pH 3) and extraction was performed by eluent solution (100% ACN). Detection was made by UV spectrophotometer at wave lengths of absorbing maximum for vitamin A – 325 nm, for vitamin D – 265 nm, for vitamin E – 295 nm.

The method was optimized. There was developed a program, where concentrations of individual vitamins, dosing volumes, flow speed and composition solvents were tested.

After the optimization method there was performed the extraction and the subsequent determination of blood plasma fortified with vitamins A, D, E by the sequential injection chromatography method. Recovery of the method for vitamin A was 156,83 %, for vitamin D 28,38 %, for vitamin E 15,79 %. Repeatability was evaluated, for which there were used three sprays of vitamins A, D, E. Results were obtained by the use of low concentrations of vitamins. The disadvantage of the method was low repeatability and poor reproducibility. For improving reproducibility and efficiency further development is needed.

# Obsah

Seznam obrázků.....	9
Seznam tabulek.....	11
Seznam zkratk.....	12
1. Úvod práce.....	13
2. Cíl a zadání práce.....	14
3. Teoretická část.....	15
3.1 Vitamíny A, D, E.....	16
3.1.1 Obecné vlastnosti.....	16
3.1.2 Vitamín A (retinol).....	16
3.1.3 Vitamín D (cholecalciferol).....	17
3.1.4 Vitamín E (alfa tokoferol).....	18
3.2 Sekvenční injekční analýza (SIA).....	19
3.2.1 Princip SIA.....	19
3.2.2 Vlastnosti SIA.....	19
3.2.3 Komponenty SIA.....	20
3.2.4 Uplatnění metody v praxi.....	21
3.3 Extrakce na tuhou fázi (SPE).....	22
3.3.1 Princip.....	22
3.3.2 Sorbenty.....	22
3.3.3 Postup SPE.....	23
3.3.4 Výhody SPE.....	24
3.4 Mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS).....	25
3.4.1 Vlastnosti a složení MEPS.....	25
3.4.2 Velikost vzorku a automatizace.....	26
3.4.3 Postup MEPS.....	26

3.4.4 Výhody .....	27
3.5 Sekvenční injekční chromatografie (SIC) .....	28
3.5.1 Vlastnosti SIC .....	28
3.5.2 Monolitické kolony .....	28
4. Praktická část .....	30
4.1 Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a příprava vzorků .....	31
4.1.1 Použité přístroje .....	31
4.1.2 Použitý materiál .....	31
4.1.3 Použité chemikálie .....	31
4.1.4 Příprava roztoků .....	32
4.1.5 Schéma přístroje .....	34
4.2 Průběh analýzy .....	35
5. Vývoj a výsledky metody .....	36
5.1 Vývoj programu .....	37
5.2 Analýza vitamínu D .....	40
5.2.1 Optimalizace koncentrace vitamínu D .....	40
5.2.2 Vývoj a optimalizace dávkovacího objemu vzorku .....	41
5.2.3 Vývoj průtokové rychlosti .....	42
5.2.4 Optimalizace roztoku vitamínu D .....	43
5.3 Analýza vitamínu A .....	45
5.4 Analýza směsi vitamínu D a A .....	47
5.5 Analýza vitamínu E .....	48
5.6 Analýza plazmy fortifikované vitamínem A, D a E .....	50
5.6.1 Analýza vzorku na SIC .....	50
5.6.2 Opakovatelnost analýzy .....	52
5.6.3 Stanovení výtěžnosti metody .....	54

6. Diskuze .....	56
7. Závěr .....	57
8. Seznam použité literatury .....	58



# Seznam obrázků

Obrázek 1: Vzorec vitamínu A. ....	16
Obrázek 2: Vzorec vitamínu D. ....	17
Obrázek 3: Vzorec vitamínu E. ....	18
Obrázek 4: Princip SIA. ....	19
Obrázek 5: Schéma SIA. ....	21
Obrázek 6: Postup SPE. ....	24
Obrázek 7: MEPS stříkačka a jehla s mikrokolonou. ....	25
Obrázek 8: Schéma mikrokolony. ....	26
Obrázek 9: Postup při analýze MEPS. ....	27
Obrázek 10: Schéma SIC. ....	28
Obrázek 11: Mezopóry a makropóry. ....	29
Obrázek 12: Schéma přístroje používaného v diplomové práci. ....	34
Obrázek 13: Analýza vitamínu D při koncentraci 50, 25 a 10 $\mu\text{M}$ . ....	40
Obrázek 14: Analýza 25 $\mu\text{M}$ vitamínu D při dávkovaném objemu 500 $\mu\text{l}$ a 250 $\mu\text{l}$ . ....	42
Obrázek 15: Analýza vitamínu D při koncentraci 10, 5 a 2 $\mu\text{M}$ v 50% methanolu. ....	43
Obrázek 16: Kalibrační křivka roztoků vitamínu D. ....	44
Obrázek 17: Analýza vitamínu A při koncentraci 10, 5 a 2 $\mu\text{M}$ v 50% methanolu. ....	45
Obrázek 18: Kalibrační křivka roztoků vitamínu A. ....	46
Obrázek 19: Analýza 2 $\mu\text{M}$ vitamínu D a 1 $\mu\text{M}$ vitamínu A. ....	47
Obrázek 20: Analýza vitamínu E při koncentracích 100, 50 a 25 $\mu\text{M}$ v 80% methanolu. ....	48
Obrázek 21: Kalibrační křivka roztoků vitamínu E. ....	49
Obrázek 22: Analýza plazmy fortifikovaná 2,5 $\mu\text{M}$ vitamínem A, 5 $\mu\text{M}$ vitamínem D a 20 $\mu\text{M}$ vitamínem E. ....	50

Obrázek 23: Zobrazení píků vitamínů D a E z fortifikované plazmy.....	51
Obrázek 24: Analýza pracovního roztoku směsi vitamínů A, D, E na SIC.....	52
Obrázek 25: Opakovatelnost analýzy 2,5 $\mu$ M vitamínu A z fortifikované plazmy.....	53
Obrázek 26: Opakovatelnost analýzy 5 $\mu$ M vitamínu D z fortifikované plazmy.....	53
Obrázek 27: Opakovatelnost analýzy 20 $\mu$ M vitamínu E z fortifikované plazmy. ....	54

## Seznam tabulek

Tabulka 1: Pracovní roztoky standardu vitamínu D.....	32
Tabulka 2: Pracovní roztoky standardu vitamínu A.....	33
Tabulka 3: Pracovní roztoky standardu vitamínu E.....	33
Tabulka 4: Popis programu č. 1.....	37
Tabulka 5: Popis programu č. 2.....	38
Tabulka 6: Jednotlivé koncentrace vitamínu D a příslušné hodnoty absorbance.....	40
Tabulka 7: Změna č. 1 v programu č. 1.....	41
Tabulka 8: Změna č. 2 v programu č. 1.....	41
Tabulka 9: Data pro kalibrační křivku vitamínu D.....	44
Tabulka 10: Data pro kalibrační křivku vitamínu A.....	46
Tabulka 11: Změna č. 3 v programu č. 1.....	47
Tabulka 12: Data pro kalibrační křivku vitamínu E.....	49
Tabulka 13: Výsledky stanovení výtěžnosti vitamínu A, D, E.....	55

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
MEPS	mikroextrakce tuhým sorbentem (Micro Extraction by Packed Sorbent)
MPV	vícecestný ventil
NP	normální fáze (Normal Phase)
RP	reverzní fáze (Reversed Phase)
SIA	sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis)
SIC	sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography)
SPE	extrakce na tuhou fázi (Solid Phase Extraction)
UV	ultrafialové spektrum
VIS	viditelné spektrum

# 1. Úvod práce

V dnešní době je důležité provádět analýzy za pomoci metod, které nevyžadují složité a nákladné přístroje a umožňují jednoduché, rychlé, citlivé, selektivní a automatizované stanovení analytů. Důležitou součástí analýzy je příprava vzorků. Jedna z nejpoužívanějších metod, která se zabývá přípravou a úpravou vzorku je extrakce na tuhou fázi (SPE). Umožňuje odstranění nežádoucích látek z matrice a zakoncentrování analytu. Výhodou metody je možnost použití nízkých objemů rozpouštědel, je rychlá a finančně relativně nenáročná.

Miniaturizací SPE byla získána nová metoda - mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS). Umožňuje výrazné snížení objemů vzorků a rozpouštědel používaných pro analýzu v rozsahu z mililitrů (SPE) na mikrolitry. Malé množství vzorků a činidel zrychluje analýzu, která trvá pouze několik minut. MEPS se může spojit s metodou kapalinové chromatografie (LC) nebo plynové chromatografie (GC) a může se zcela automatizovat. Je výhodná především pro stanovení léčiv a jejich metabolitů v biologické matrici (krev, moč, plazma).

V této diplomové práci bylo vyzkoušeno propojení sekvenční injekční analýzy (SIA) s MEPS a ověřeno, zda při analýze jsou zachovány zmíněné výhodné vlastnosti.

## **2. Cíl a zadání práce**

Cílem práce bylo zjistit možnosti automatizace extrakce na tuhou fázi (SPE) s využitím mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS) a metody sekvenční injekční analýzy (SIA).

Dalším úkolem bylo zjistit chování krevní plazmy při této metodě a vytvořit reprodukovatelnou metodu pro stanovení vitamínů A, D, E ve fortifikované krevní plazmě.

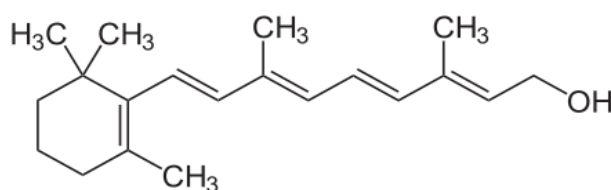
### **3. Teoretická část**

## 3.1 Vitamíny A, D, E

### 3.1.1 Obecné vlastnosti

Vitamíny A, D a E patří mezi vitamíny rozpustné v tucích a mají lipofilní vlastnosti. Díky lipofilnímu charakteru dobře pronikají do tkání a ukládají se v organismu, kde tvoří zásobu na několik týdnů až měsíců. Vitamíny A a D se distribuují do jater, vitamín E do tukové tkáně. Vlivem dlouhého biologického poločasu a pomalého vylučování z organismu, může docházet u vitamínu A a D k riziku hypervitaminózy, která může vyvolat závažné toxické projevy. Většinou je toto riziko spojeno s léčbou vitamíny A a D, kdy dochází k nesprávnému dávkování. Hypovitaminóza vzniká ve srovnání s vitamíny rozpustnými ve vodě méně často. Hlavní příčinou nedostatečné tvorby je dlouhodobá porucha vstřebávání tuků, kdy je zároveň omezena i absorpce vitamínů A, D, E [1].

### 3.1.2 Vitamín A (retinol)



Obrázek 1: Vzorec vitamínu A [2].

Sumární vzorec:  $C_{20}H_{30}O$

Chemický vzorec: (2E,4E,6E,8E)-3,7-dimethyl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex-1-enyl)nona-2,4,6,8-tetraen-1-ol [2].

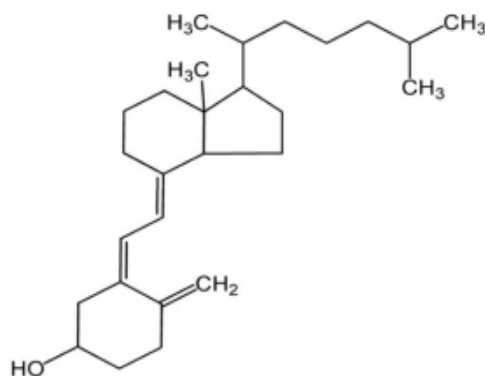
Vitamín A má důležitou funkci v procesu vidění. Tvoří zrakový pigment rhodopsin, který umožňuje vidění za nízkého osvětlení. Odpovídá za správný vývoj epitelálních buněk sliznice, správný vývoj kostí a podporuje činnost pohlavních žláz. Zdrojem vitamínu A jsou potraviny živočišného původu (játra) nebo karoteny, což jsou provitamíny vitamínu A, které se získávají z potravin původu rostlinného (mrkev, rajčata). Karoteny mají antioxidační a protikancerogenní účinky [3].



Nedostatek vede k poruchám zraku, které se nejdříve projevují šeroslepostí. Mezi další příznaky hypovitaminózy patří nedostatečná odolnost proti infekcím a suchá kůže [4].

Pokud jsou dávky vitamínu A příliš vysoké nastupuje hypervitaminóza projevující se bolestmi kloubů, anorexií, suchou kůží. Zvláště nebezpečná je u těhotných žen, může způsobit malformace u plodu [5].

### 3.1.3 Vitamín D (cholecalciferol)



Obrázek 2: Vzorec vitamínu D [2].

Sumární vzorec:  $C_{27}H_{44}O$

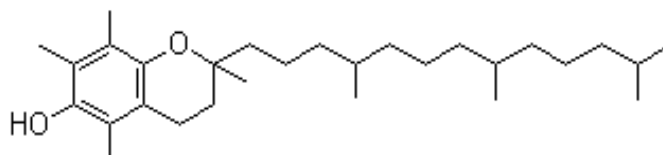
Chemický vzorec: (5Z, 7E)-9,10-sekokocholesta-5,7,10(19)-trien-3β-ol [2].

Prekurzorem vitamínu D<sub>3</sub> (cholecalciferolu) je 7-dehydrocholesterol, což je derivát cholesterolu. Z tohoto prekurzoru se vytváří vitamín D<sub>3</sub> v kůži za využití slunečního záření. Společně s vitamínem D<sub>2</sub> (ergokalciferolem) tvořícího se v rostlinách, je výchozí látkou pro syntézu hormonu zvaný kalcitriol, který má významnou funkci při homeostáze vápníku a hořčíku. Podporuje resorpci vápníku a hořčíku ve střevě a podobně působí i v ledvinách, kde podporuje zpětnou resorpci vápníku a snižuje vylučování vápníku močí. Tím zvyšuje plazmatickou koncentraci vápníku a hořčíku v plazmě a reguluje mineralizaci kostní tkáně [3].

Nedostatek vitamínu D vede k poruchám mineralizace kostí. U dětí dochází ke křivici, projevující se kostními deformacemi a může vést až k invalidizaci. Příjmem rybího tuku se dá výskytu křivice předejít. U dospělých se při nedostatku vitamínu D objevuje osteomalacie, kdy dochází k měknutí kostí a svalové slabosti [3].

Při podávání vyšších dávek D může dojít k hypervitaminóze. Zvýší se výrazně koncentrace vápníku a objevují se GIT poruchy. Dochází k selhání ledvin, které může mít fatální následky [4].

### 3.1.4 Vitamín E (alfa tokoferol)



Obrázek 3: Vzorec vitamínu E [2].

Sumární vzorec:  $C_{29}H_{50}O_2$

Chemický vzorec: (2RS)-2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4RS,8RS)-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol [2].

Vitamín E je nejvýznamnějším antioxidantem v organismu. Chrání organismus před účinky volných radikálů, zpomaluje stárnutí a preventivně působí proti vzniku nádorů. Podporuje činnost nervového a svalového systému a pozitivně působí na pohlavní buňky. Zdrojem vitamínu E jsou rostlinné oleje, obilné klíčky nebo listová zelenina. V organismu je součástí biologických membrán, kde chrání nenasycené mastné kyseliny před oxidací [6].

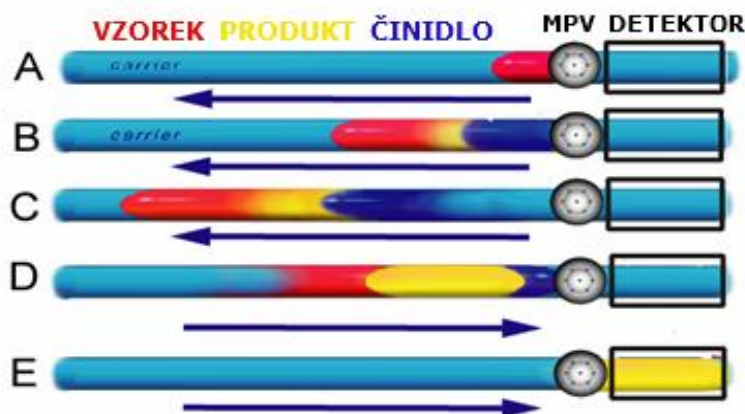
V porovnání s vitamíny A a D je vitamín E málo toxický. Při vyšších dávkách a dlouhodobém užívání zamezuje absorpci vitamínů K a dochází ke zvýšené srážlivosti krve [3].

Nedostatek vitamínu se projevuje svalovou slabostí, neurologickými potížemi nebo poruchou plodnosti [4].

## 3.2 Sekvenční injekční analýza (SIA)

### 3.2.1 Princip SIA

SIA je průtoková analytická metoda, umožňující snadnou automatizaci analýz, kde je nutné pracovat s velkým počtem vzorků. Je to metoda univerzální, která je založena na programovatelném a obousměrném průtoku. Zóna vzorku a zóna činidla jsou postupně aspirována do nosného proudu prostřednictvím selekčního vícecestného ventilu a pístového čerpadla. Poté dochází ke změně směru toku pomocí čerpadla a vzorek s činidlem se vzájemně mísí za vzniku reakčního produktu, který je transportován do detektoru, kde dochází k monitorování. Je zaznamenáván analytický signál ve formě píku [7].



Obrázek 4: Princip SIA [7].

### 3.2.2 Vlastnosti SIA

SIA systém využívá synchronizaci mezi naprogramovanými pohyby pístu čerpadla a přepínáním jednotlivých poloh selekčního ventilu. Tato synchronizace a přesné opakování kroků, které jsou naprogramované, umožňuje reprodukovatelnost disperze vzorku a činidla, a tedy i reprodukovatelnost koncentračního gradientu výsledného produktu. Proto součástí metody SIA je i počítač, jehož prostřednictvím jsou nastaveny jednotlivé kroky měřicího cyklu a zároveň sbírá a hodnotí výstupní data [8].

Během jednotlivých cyklů měření se můžou programováním měnit objemy dávkovaných vzorků, a to v rozsahu jednotek až stovek  $\mu\text{l}$  a dochází k optimalizaci

disperze vzorku a citlivosti nastavení. Průtokové rychlosti se pohybují kolem  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  [9].

Výhodou SIA systému je nízká spotřeba činidel i vzorků, minimální produkce odpadu, nízké provozní náklady. Tato metoda je využívána pro svou programovou všestrannost a flexibilitu, kdy se dají snadno změnit parametry měření pomocí počítače a není nutná změna konfigurace SIA systému [10].

### 3.2.3 Komponenty SIA

#### 1. Čerpadlo (pístová pumpa)

- Tvoří tok nosného proudu.
- Pumpa musí čerpat roztoky v obou směrech.
- Pumpa je ovládaná počítačem, rychlost pohybu pumpy lze libovolně měnit.
- Pracuje i s malými objemy kapalin.

#### 2. Selekční vícecestný ventil (dávkovací systém)

- Zajišťuje aspiraci požadovaných roztoků do systému.
- Nejčastěji se jedná o 6, 8 a 10-cestné ventily.

#### 3. Reakční (mísící) cívky

- Využívají se buď k promísení zón nebo obsahují reaktivní náplň.

#### 4. Světelný zdroj

#### 5. Průtoková cela

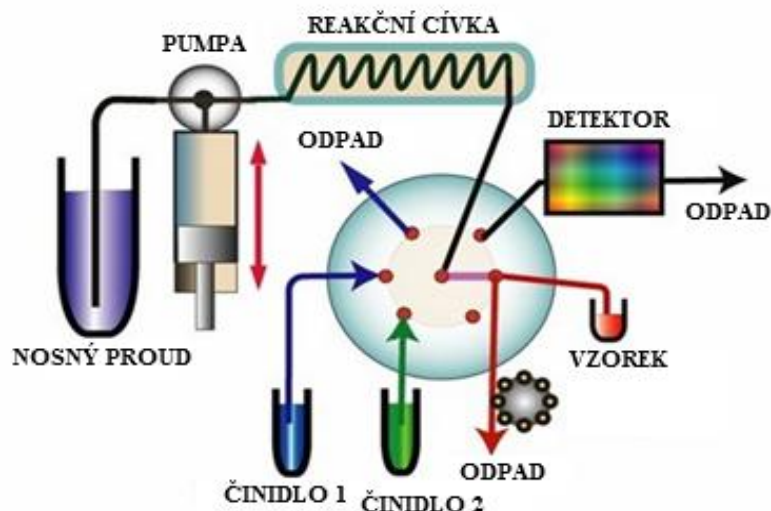
- Optická délka je 0,01 – 50 cm.

#### 6. Detektor

- Volba detektoru závisí na použité analytické reakci.
- Využívají se nejčastěji spektrofotometrické (UV/VIS, fluorescenční), dále se využívají elektrochemické (potenciometrické, amperometrické).

#### 7. Software

- Řídí celý proces automatické analýzy včetně sběru a hodnocení dat.
- Zároveň zpracovává a prezentuje výsledky (např. vypočítá výšku, plochu a další parametry píku).
- Příklady programů: FlowTEK, FIALab [9, 11].



Obrázek 5: Schéma SIA [7].

### 3.2.4 Uplatnění metody v praxi

Metoda je využívána při monitorování životního prostředí, kdy se uplatňuje při stanovení některých anorganických iontů (hořečnatých, vápenatých, dusitanů, dusičnanů) ve vodě za účelem zjištění její kvality. Metoda se hojně uplatňuje také při farmaceutických a bioanalytických analýzách (imunoanalytické reakce) nebo analýze potravin.

U farmaceutických analýz tato metoda zjišťuje kvalitu a účinnost léčiv, pomáhá zjistit stejnoměrnost obsahu účinné látky v daném léčivém přípravku a rychlost jejího uvolňování z lékové formy [7].

## 3.3 Extrakce na tuhou fázi (SPE)

SPE je moderní extrakční metoda a v současnosti se stala nejpoužívanější metodou pro rychlou a selektivní přípravu vzorku. Metoda má více možností užití. Je využívána pro extrakci analytu z kapalně fáze vzorku, zvyšuje koncentraci analytu a odstraňuje nežádoucí látky z matrice, které by mohly interferovat s analýzou. Tím získáváme čistý extrakt o vysoké čistotě a koncentraci, který se následně může stanovit chromatografickou metodou [12].

### 3.3.1 Princip

Jedná se o jednoduchou techniku. Kapalně vzorek je dávkován na SPE kolonku, kde se váže na tuhou fázi. Vzorek musí mít silnější afinitu k tuhé fázi a slabší afinitu k fázi kapalně, ve které se rozpouští. Nežádoucí příměsi jsou selektivně odděleny z analytu vhodnými rozpouštědly. Analyt se nakonec získává ze sorbentu elučním rozpouštědlem. Mechanismus sorpce je podobný jako u kapalinově chromatografie, a tudíž i nabídka sorbentů je podobná [13].

### 3.3.2 Sorbenty

Důležité je vybrat správně sorbent. Sorbent volíme především na základě vlastností analytu a vlastností matrice. Při SPE se analyt váže na sorbent, který je uložen v SPE kolonkách nebo na discích. SPE dělíme podle typu sorbentu na normální, iontově výměnnou a reverzní [14].

Metoda reverzní fáze (RP) má nejméně selektivní retenční mechanismus, to znamená, že požadovaná látka se hůře odděluje od ostatních příměsí ve vzorku, což je způsobeno vlivem podobných strukturních vlastností. Výhodou ale je, že sorbent RP zadrží většinu hydrofóbních látek, proto se využívá pro extrakci látek, které mají různorodou strukturu v rámci téhož vzorku. RP se tedy vyznačuje hydrofóbními vlastnostmi a využívá se pro extrakci nepolárních sloučenin. Nejdříve se uplatňují nepolární nebo hydrofóbní interakce mezi sorbentem a kapalně vzorkem prostřednictvím van der Waalsových sil. Poté dochází k narušení těchto interakcí vhodným rozpouštědlem nebo směsí rozpouštědel (např. methanol, ACN) a analyt se eluuje [15].

Polární vázané fáze (NP) jsou selektivní u polárních látek. Uplatňují se zde polární interakce (vodíkové vazby, interakce dipól-dipól) mezi sorbentem a vzorkem.

Interakce narušuje polární rozpouštědlo a dochází k eluci analytu. NP je vysoce selektivní, dobře se separují i sloučeniny podobné struktury [16].

Iontově výměnná fáze je fáze, při níž sorbent má povahu iontoměniče (katex, anex) a při sorpci dochází k výměně iontů mezi sorbentem a analytem, který existuje v ionizované formě. Uplatňují se elektrostatické síly a k eluci je nutná úprava pH analytu. Iontová výměna může probíhat současně s hydrofobní interakcí, což umožňuje zvýšení selektivity extrakce [17].

Sorbenty jsou nejčastěji na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu. Na povrchové silanolové skupiny silikagelu se váží skupiny buď hydrofilních či lipofilních vlastností a určují charakter sorbentu. Nejčastěji používané fáze jsou C18, CN, C8, NH<sub>2</sub>, COOH, Silica, SAX, SCX [13].

### **3.3.3 Postup SPE**

SPE zahrnuje 6 následujících kroků:

#### **1. Příprava vzorku před extrakcí**

Je nutné připravit vzorek daných fyzikálně-chemických vlastností, které podporují jeho zachycení sorbentem. Tuhé látky musí být převedeny do roztoku nebo mohou být tuhé látky extrahovány kapalinou před použitím SPE. V případě, že vzorek obsahuje pevné částičky nečistot, musí se zfiltrovat. Pokud je analyt ve vzorku chemicky vázán na velké molekuly (příkladem může být léčivo vázané na bílkoviny), musí být vazby rozrušeny a poté nastává účinná extrakce.

#### **2. Předúprava kolonky**

Kolonku respektive v ní umístěný sorbent upravíme solvatací, tím zajistíme, aby se vzorek zadržoval na sorbentu. Poté se promyje sorbent předepsaným rozpouštědlem, čímž se sorbent aktivuje a následně se promyje rozpouštědlem podobným vzorku.

#### **3. Dávkování vzorku**

Vzorek se dávkuje na kolonku a interaguje se sorbentem. Analyt se na sorbentu zachytí a látky tvořící matici vzorku sorbentem pouze prochází.

#### **4. Promývání kolonky**

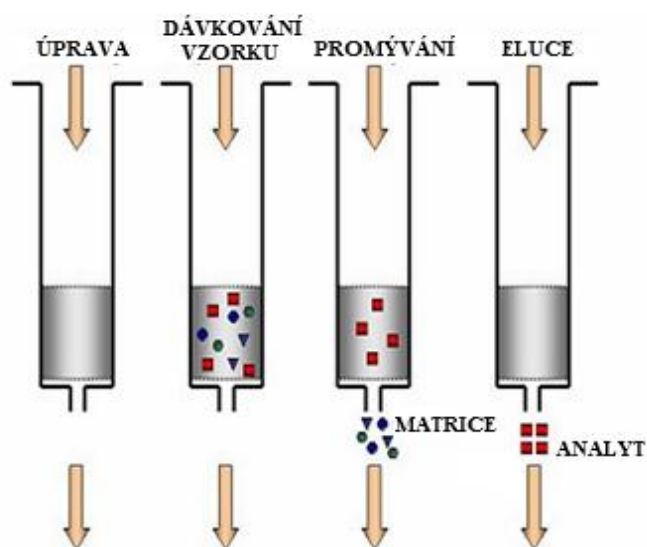
Promývání kolonky vhodným rozpouštědlem umožňuje selektivní eluci nežádoucích látek matrice ze sorbentu, přičemž analyt zůstává vázán na sorbentu a není eluován.

## 5. Sušení

V případě, že se promývací rozpouštědlo svými vlastnostmi výrazně liší od elučního rozpouštědla, kolonka se vysuší inertním plynem. Nejčastěji se jako inertní plyn využívá dusík.

## 6. Eluce

Dochází k eluci analytu promytím kolonky elučním rozpouštědlem, vzniklý eluát se jímá do vhodné jímací nádoby a může se dále využívat pro chromatografickou analýzu [12, 13].



Obrázek 6: Postup SPE [18].

### 3.3.4 Výhody SPE

- Možnost práce s menšími objemy vzorků.
- Nízké objemy organických rozpouštědel, metoda je rychlejší a levnější.
- Široký výběr SPE kolonek.
- Snadná automatizace.
- Zakoncentrování stopových množství látek.
- Vysoká výtěžnost [12, 19].



## 3.4 Mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS)

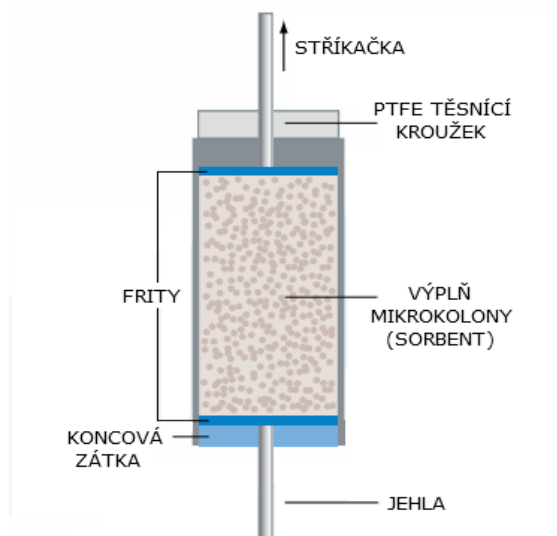
### 3.4.1 Vlastnosti a složení MEPS

Mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS) je moderní mikroextrakční technika přípravy vzorků. MEPS je miniaturizovaná klasická SPE metoda. Na rozdíl od SPE využívá menší objemy vzorků (až do 10  $\mu\text{l}$ ) a rozpouštědel a lze ji plně automatizovat. Principem metody je sorpce analytu na tuhou fázi, která je umístěna ve formě mikrokolony v injekční jehle a jehla je integrována do injekční stříkačky [20]. MEPS má stejné funkce jako SPE. Odstraňuje rušivé látky z matrice, umožňuje izolaci analytů ze vzorku a zvyšuje koncentraci analytů. MEPS technika je využívána pro analýzu celé řady analytů z biologických vzorků (plazma, sérum, moč). Při analýze jsou využívány sorbenty typu reverzní fáze, normální fáze, iontově výměnné fáze nebo směšného modu, tedy podobné jako u SPE [21].



Obrázek 7: MEPS stříkačka a jehla s mikrokolonou [22].

MEPS je složena ze dvou komponent, stříkačky MEPS a jehly s mikrokolonou. V mikrokoloně je umístěný SPE sorbent (C18, C8, Silica, C8/SCX) a sorbent je zabudovaný do stříkačkové jehly. Mikrokolona se společně s plynotěsnou stříkačkou o objemu 100 nebo 250  $\mu\text{l}$  využívá k dávkování kapalin za stejných podmínek jako u SPE. V případě, že aktivita sorbentu klesne nebo je nutný k analýze jiný sorbent, dá se snadno vyměnit odšroubováním pojistné matice mikrokolony [23].



Obrázek 8: Schéma mikrokolony [21].

### 3.4.2 Velikost vzorku a automatizace

Při analýze se pracuje s velmi malým objemem vzorků, může se použít až pouze 10  $\mu\text{l}$ . Větší vzorky, jejichž objem se pohybuje kolem 1 ml, se musí zpracovat nebo zakoncentrovat odebráním alikvótních podílů 100 nebo 250  $\mu\text{l}$ .

Automatizace, tedy „online“ analýza vzorku, přičemž se pracuje pouze s jedním zařízením, zkracuje dobu analýzy a analytik nemusí do procesu tak často zasahovat. Jehlu se sorbentem je možné použít 40 až 100 krát (počet užití závisí na konkrétním vzorku), aniž by došlo ke snížení výkonu jehly. Malé množství sorbentu lze snadno promývat vhodným rozpouštědlem mezi jednotlivými analýzami a tím se snižuje možnost kontaminace se vzorky. MEPS stříkačky umožňují manipulaci se vzorky ručně nebo s využitím automatických dávkovacích zařízení, přičemž nejsou nutné úpravy (Thermo Scientific, HTA 300APLU, CTC Analytics) [23].

### 3.4.3 Postup MEPS

#### 1. Aplikace vzorku

Do stříkačky je aplikován vzorek (10 až 250  $\mu\text{l}$ ), prochází mikrokolonou, kde je umístěn sorbent a sledované analyty se naváží na sorbent. Vzorek může být pumpován do stříkačky a ze stříkačky několikrát a tím je dosaženo zakoncentrování analytů na sorbentu.

#### 2. Promytí sorbentu

K promytí sorbentu je použit promývací roztok o objemu 50 až 250  $\mu\text{l}$ . Promývacím roztokem je nejčastěji voda nebo směs vody s kyselinou mravenčí.

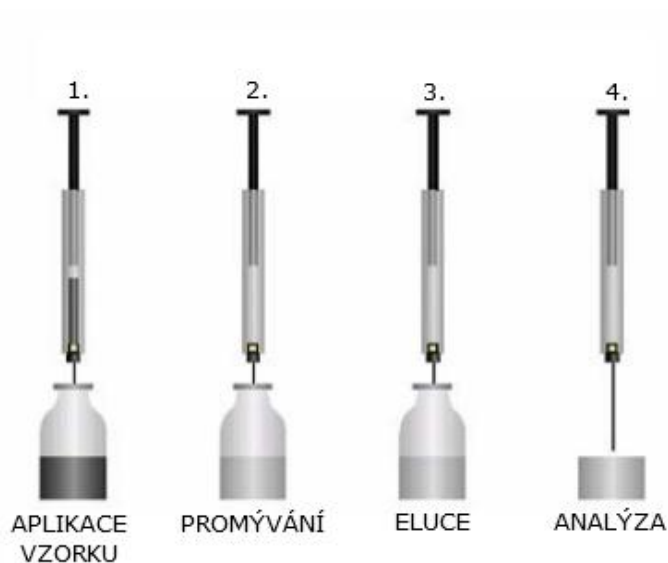
Promytím dochází k odstranění rušivých látek z matrice vzorku. Pokud je potřeba, je možné tento krok opakovat, ale hrozí, že bude snížena výtěžnost.

### 3. Eluce analytů

Jelikož se k analýze využívá jen velmi malé množství sorbentu, jsou analyty desorbovány malým množstvím elučního rozpouštědla (např. 50  $\mu$ l směsi methanolu s vodou).

### 4. Analýza

Eluované analyty jsou transportovány na chromatografický systém a analyzovány [24].



Obrázek 9: Postup při analýze MEPS [21].

#### 3.4.4 Výhody

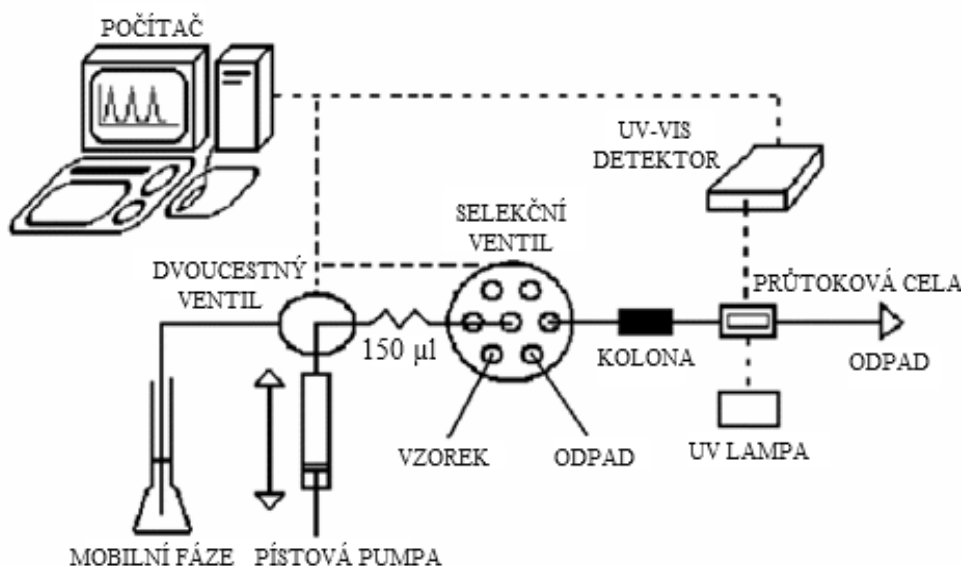
- Extrakce z mnohem menších objemů vzorků a malé množství rozpouštědel oproti SPE.
- Ve srovnání s SPE se snížila doba přípravy vzorků z hodin na minuty.
- MEPS lze plně automatizovat.
- Je využíván pro úpravu vzorku před HPLC analýzou.
- MEPS lze spojit online s LC nebo GC.
- MEPS stříkačky lze použít několikrát, kdežto klasický SPE sloupec jen jednou.
- Dávkování, extrakce a nástřik do chromatogramu je umožněno stejnou stříkačkou.
- Relativně nízká cena ve srovnání s SPE, jednoduchost a rychlost [23, 25].

## 3.5 Sekvenční injekční chromatografie (SIC)

### 3.5.1 Vlastnosti SIC

Sekvenční injekční chromatografie je chromatografická průtoková metoda, která byla vytvořena zavedením krátké monolitické kolony do systému SIA mezi selekční ventil a průtokovou celu detektoru. Představuje alternativu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a umožňuje separaci vícesložkového vzorku, přičemž průtok mobilní fáze probíhá za nízkého tlaku [26].

SIC si zachovává výhodné vlastnosti SIA metody, nabízí možnost automatizace a miniaturizace, analýza je rychlá a výhodou je také malá spotřeba vzorku a činidel a tím i minimální tvorba odpadu. Ve srovnání s HPLC není metoda SIC náročná na údržbu a provozní náklady na analýzu jsou nízké [27].



Obrázek 10: Schéma SIC [27].

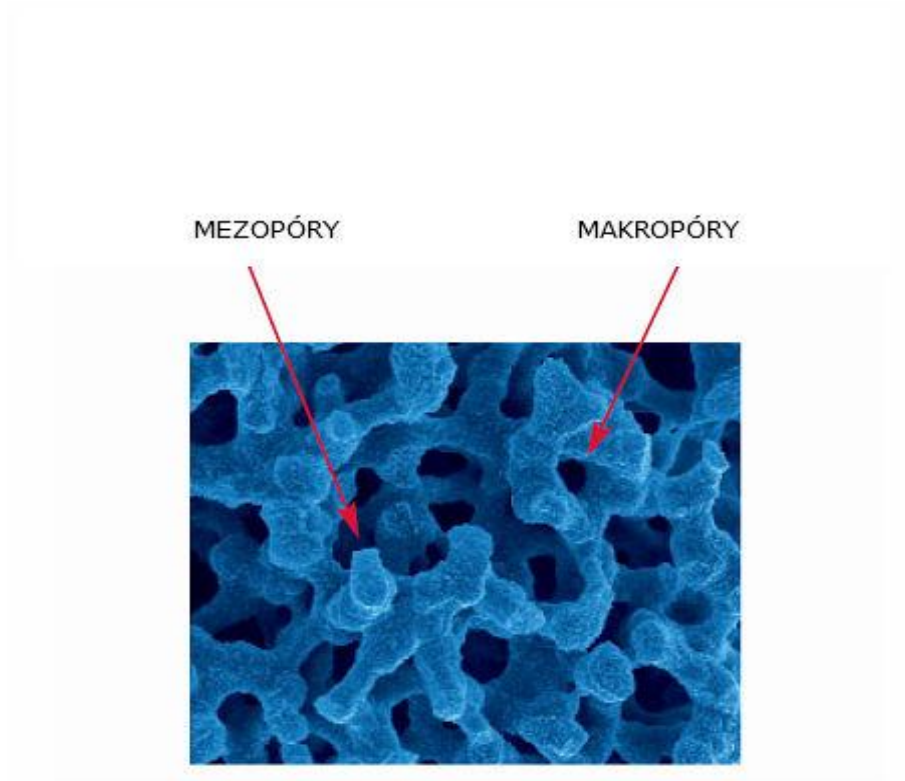
### 3.5.2 Monolitické kolony

K separaci malých molekul jsou používány monolitické kolony obsahující sorbent z anorganického materiálu. Nejčastěji se používají chemicky vázané fáze, kde nosičem je silikagel [28].

Monolitické kolony jsou vytvořeny sol-gel procesem, tedy hydrolyzou a polykondenzací tetramethoxysilanových skupin v polyethylenoxidu, což umožňuje tvorbu vysoce porézní kolony. V porovnání s HPLC nejsou tvořeny jednotlivými drobnými částicemi sorbentu dané velikosti, ale pouze jedním kusem sorbentu, který je

vysoce porézní. U klasické HPLC je nutný vysoký tlak mobilní fáze z důvodu průtoku přes mezičásticové prostory, které jsou velmi malé a kladou vysoký odpor. Naproti tomu velkou výhodou monolitického porézního sorbentu je, že klade minimální odpor mobilní fázi, čímž se zrychlí její průtok systémem a analýza proběhne výrazně rychleji. Kolona je méně namáhána a vykazuje dobrou výkonost, delší životnost a lepší reprodukovatelnost [28, 29].

Monolitický sorbent se skládá z makropórů a mezopórů a vykazuje bimodální charakter. Makropóry (velké póry) s průměrnou velikostí 2  $\mu\text{m}$  umožňují rychlý průtok mobilní fáze kolonou za využití nízkých tlaků, protože sorbent neklade vysoký odpor. Mezopóry (póry s velkým povrchem), jejichž průměrná velikost je 13nm nabízí monolitu velkou plochu, tím získávají vysokou separační kapacitu, kterou využívají k adsorpci a následnému oddělení analytů [30].



Obrázek 11: Mezopóry a makropóry [31].

## **4. Praktická část**

## 4.1 Použité přístroje, pomůcky, chemikálie a příprava vzorků

### 4.1.1 Použité přístroje

- analytické váhy SARTORIUS ANALYTIC A200S
- centrifuga EBA 21, Hettich
- spektrofotometrický detektor Ocean Optics USB4000
- digitální pH-metr Hanna instruments pH212
- hadičky teflonové – vnitřní průměr 0,25; 0,5 a 0,75 mm, Upchurch Scientific
- lampa MICROPACK DH 2000, Deuterium, Halogen
- MicroSIA přístroj, FIALab instruments, Inc., vybavený 8 – cestným selekčním ventilem a nástavcem LAB-ON-VALVE
- automatické pipety Biohit M
- průtoková cela s optickou délkou 20 mm (teflon), FIALab
- ultrazvuková lázeň Sonorex RK 100
- zkumavky ependorf 1,5 ml
- přístroj SICrom, FIALab instruments, Inc., vybavený dvěma selekčními ventily – 8 a 6 pozic a silnější pumpou Sapphire
- dvupolohový ventil na přepnutí kanálu (ruční ovládání)

### 4.1.2 Použitý materiál

- MEPS kolona – MEPS BIN for HTA 300APlus SGE
- Monolitická kolona Chromolith® FastGradient RP-18 endcapped 50 – 2 mm a předkolona Chromolith® RP-18e 5 – 2 mm, Merck

### 4.1.3 Použité chemikálie

- methanol pro HPLC  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)
- acetonitril pro HPLC  $\geq 99,9\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)
- octová kyselina  $\geq 99,5\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)
- superčistá voda – z přístroje Millipore Milli-Q RG

- lyofilizovaná krevní plazma LYOHUM N 10x5, 1, LOT 141407
- vitamín D, Cholekalciferol  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)
- vitamín A, Retinol  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)
- vitamín E, ( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocopherol  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, Praha)

#### 4.1.4 Příprava roztoků

##### 4.1.4.1 Příprava nosného proudu a promývacího roztoku

Nosný proud byl připraven smísením vody a kyseliny octové na pH 3. Nosný proud má stejné složení jako promývací fáze, která slouží k promytí sorbentu před tím, než dojde k nadávkování vzorku a také slouží k vymývání balastu ze sorbentu.

##### 4.1.4.2 Příprava zásobních roztoků standardů

Standardy vitamínů A, D byly rozpuštěny v methanolu, standard vitamínu E v hexanu. Koncentrace zásobních roztoků byla 1000  $\mu\text{M}$  vitamínu D, 1000  $\mu\text{M}$  vitamínu A a 2000  $\mu\text{M}$  vitamínu E.

##### 4.1.4.3 Příprava pracovních roztoků standardů

Pracovní roztoky byly připraveny s postupně se snižující koncentrací. V průběhu analýzy byly optimalizovány podmínky, které umožnili lepší identifikaci vzorku.

Tabulka 1: Pracovní roztoky standardu vitamínu D.

Č.	Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Objem zásobního roztoku vitamínu D ( $\mu\text{l}$ )	Objem nosného proudu ( $\mu\text{l}$ )	Objem methanolu ( $\mu\text{l}$ )
1.	50	75	1425	0
2.	25	37,5	1462,5	0
3.	10	15	1485	0
4.	5	750 ze směsi 10 $\mu\text{M}$	750	0
5.	10	15	742,5	742,5
6.	5	750 ze směsi 10 $\mu\text{M}$	375	375
7.	2	300 ze směsi 10 $\mu\text{M}$	600	600



Tabulka 2: Pracovní roztoky standardu vitamínu A.

Č.	Koncentrace (μM)	Objem zásobního roztoku vitamínu A (μl)	Objem nosného proudu (μl)	Objem methanolu (μl)
1.	10	15	742,5	742,5
2.	5	750 ze směsi 10 μM	375	375
3.	2	300 ze směsi 10 μM	600	600

Tabulka 3: Pracovní roztoky standardu vitamínu E.

Č.	Koncentrace (μM)	Objem zásobního roztoku vitamínu E (μl)	Objem nosného proudu (μl)	Objem methanolu (μl)
1.	100	75 μl - odpařen do sucha	1200	300
2.	50	37,5 μl - odpařen do sucha	1200	300
3.	25	18,75 μl - odpařen do sucha	1200	300

#### 4.1.4.4 Příprava pracovního roztoku směsi vitamínů A, D, E

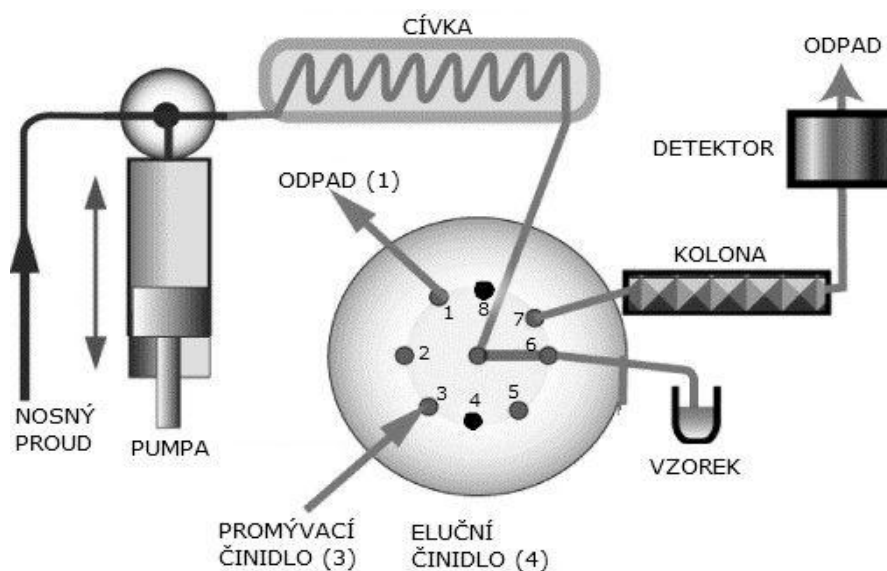
Při přípravě pracovního roztoku směsi vitamínů A, D a E bylo pipetováno do zkumavky-ependorf 100 μl vitamínu E, který byl odpařen do sucha dusíkem. Po vysušení dusíkem bylo dále do zkumavky pipetováno 50 μl vitamínu D a 25 μl vitamínu A. Koncentrace vitamínu A byla 2,5 μM, koncentrace vitamínu D 5 μM a koncentrace vitamínu E 20 μM.

#### 4.1.4.5 Příprava vzorku

Vzorek byl připraven z lyofilizované lidské plazmy. K plazmě bylo přidáno 4 ml vody. K analýze bylo nutné použít pouze nesrážlivou část plazmy bez bílkovin. Bylo pipetováno 600 μl plazmy, 600 μl methanolu a 75 μl standardu. Poté byl vzorek stočen na centrifuze 5 min při 3000 otáčkách. Na spodu zkumavky zůstala sražená plazma a k analýze byla odebrána pouze plazma bez bílkovin (svrchní část).

### 4.1.5 Schéma přístroje

Přístroj, na kterém bylo měření prováděno, byl sestaven z pístové pumpy opatřené dvoucestným ventilem, osmicestného selekčního ventilu, kolony, průtokové cely, UV-lampy a detektoru.



Obrázek 12: Schéma přístroje používaného v diplomové práci.

## 4.2 Průběh analýzy

Před analýzou byly připraveny pracovní roztoky. Do systému byl nejdříve nadávkován nosný proud. Poté byl selekční ventil přepnut na pozici č. 3, byla nadávkována promývací fáze, která byla shodná s nosným proudem. Následně byl sorbent aktivován 100% ACN z pozice č. 4. Po aktivaci byl sorbent promyt nosným proudem a poté byl dávkován vzorek z pozice č. 6. a byl zachycen na sorbent. Po zachycení vzorku na sorbent byl sorbent promyt promývací fází, aby došlo k odstranění balastu. Poté byl sorbent promyt elučním činidlem z pozice č. 4 a došlo k eluci vzorku. Detekce byla spektrofotometrická v UV oblasti při vlnových délkách 325, 265 a 295 nm.

## **5. Vývoj a výsledky metody**

## 5.1 Vývoj programu

SIA – přístroj je ovládán počítačem, proto byl vytvořen program, který ovládá jednotlivé součásti přístroje. Program byl několikrát změněn – optimalizován, než byl vytvořen program konečný, podle něhož probíhaly jednotlivé analýzy. Popis programu, podle kterého probíhala extrakce je uveden v tabulce.

Tabulka 4 popisuje program nutný k provedení extrakce metodou SIA.

Tabulka 5 popisuje program nutný k provedení extrakce metodou SIC.

Tabulka 4: Popis programu č. 1.

<b>Krok č.</b>	<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz</b>
1.	dvoucestný ventil	poloha in
2.	pumpa	nasátí 400 $\mu$ l, rychlostí 100 $\mu$ l/s
3.	dvoucestný ventil	poloha out
4.	spektrofotometr	měření absorbance
5.	spektrofotometr	měření referenčního spektra
6.	vícecestný ventil	poloha 3 – nosný proud
7.	pumpa	nasátí 200 $\mu$ l, rychlostí 20 $\mu$ l/s
8.	vícecestný ventil	poloha 4 – průtoková cela
9.	pumpa	vytlačení rychlostí 20 $\mu$ l/s
10.	dvoucestný ventil	poloha in
11.	pumpa	nasátí 400 $\mu$ l, rychlostí 100 $\mu$ l/s
12.	dvoucestný ventil	poloha out
13.	vícecestný ventil	poloha 6 – vzorek
14.	pumpa	nasátí 100 $\mu$ l, rychlost 20 $\mu$ l/s
15.	vícecestný ventil	poloha 4 – průtoková cela
16.	pumpa	vytlačení rychlostí 5 $\mu$ l/s
17.	dvoucestný ventil	poloha in
18.	pumpa	nasátí 500 $\mu$ l, rychlostí 100 $\mu$ l/s

19.	dvoucestný ventil	poloha out
20.	vícecestný ventil	poloha 3 – promývací fáze
21.	pumpa	nasátí 400 $\mu$ l, rychlost 50 $\mu$ l/s
22.	vícecestný ventil	poloha 4 – eluční činidlo
23.	pumpa	vytlačení rychlostí 10 $\mu$ l/s
24.	spektrofotometr	měření referenčního spektra

Tabulka 5: Popis programu č. 2.

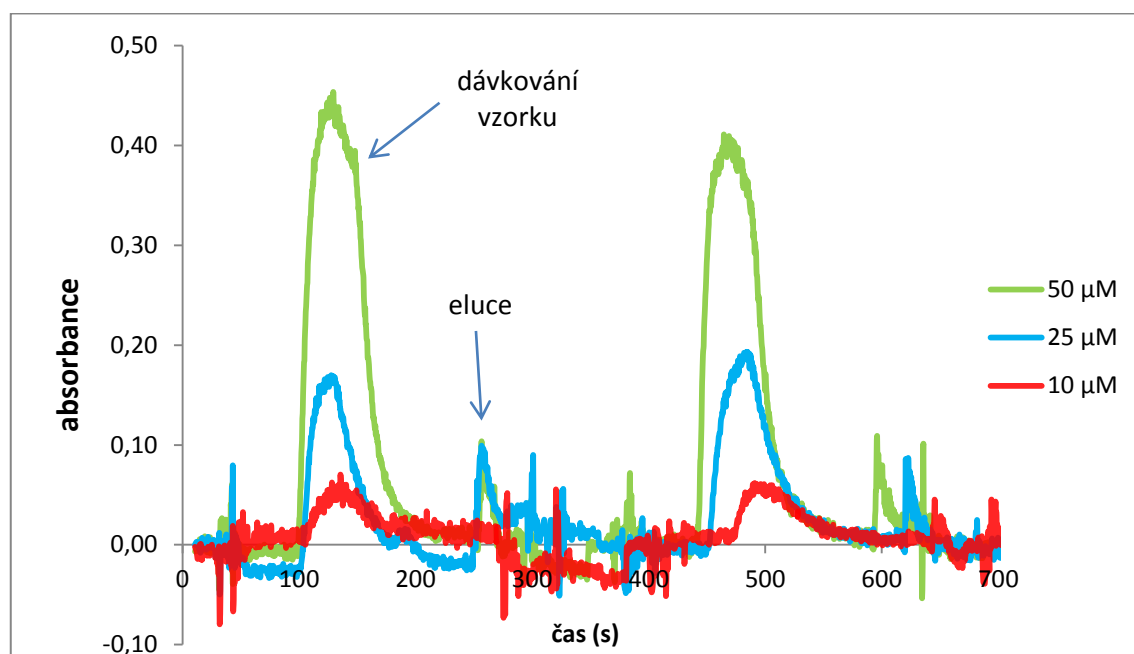
<b>Krok č.</b>	<b>Jednotka</b>	<b>Příkaz</b>
1.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 2
2.	pumpa	nasátí 800 $\mu$ l, rychlostí 70 $\mu$ l/s
3.	pumpa	zadržení, prodlení 4s
4.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 7
5.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 3
6.	pumpa	vytlačení 500 $\mu$ l, rychlostí 10 $\mu$ l/s
7.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 5
8.	pumpa	nasátí 500 $\mu$ l, rychlostí 20 $\mu$ l/s
9.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 3
10.	pumpa	vytlačení 400 $\mu$ l, rychlostí 10 $\mu$ l/s
11.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 6
12.	pumpa	nasátí 500 $\mu$ l, rychlostí 20 $\mu$ l/s
13.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 3
14.	pumpa	vytlačení 600 $\mu$ l, rychlostí 5 $\mu$ l/s
15.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 5
16.	pumpa	nasátí 500 $\mu$ l, rychlostí 20 $\mu$ l/s
17.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 3
18.	pumpa	vytlačení 700 $\mu$ l, rychlostí 10 $\mu$ l/s
19.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 1

20.	pumpa	vyprázdnění
21.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 2
22.	pumpa	nasátí 2000 $\mu\text{l}$ , rychlostí 70 $\mu\text{l/s}$
23.	pumpa	zadržení, prodlení 4s
24.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 7
25.	levý vícecestný ventil	ventil poloha 3
26.	pumpa	vytlačení 100 $\mu\text{l}$ , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
27.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 8
28.	pumpa	nasátí 100 $\mu\text{l}$ , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
29.	pravý vícecestný ventil	ventil poloha 3 – vzorek
30.	pumpa	vytlačení 2100 $\mu\text{l}$ , rychlostí 10 $\mu\text{l/s}$
31.	pumpa	zadržení, prodlení 10s
32.	spektrofotometr	měření absorbance
33.	spektrofotometr	měření referenčního spektra
34.	pumpa	počká - konec analýzy

## 5.2 Analýza vitamínu D

### 5.2.1 Optimalizace koncentrace vitamínu D

Nejdřív byla analýza provedena s roztokem vitamínu D ve směsi vody s kyselinou octovou. Byly postupně snižovány koncentrace vitamínu D v roztoku a byla sledována hodnota absorbance. První měřená koncentrace byla 200  $\mu\text{M}$  dále 100, 50, 25 a 10  $\mu\text{M}$ . Analýza byla provedena za podmínek viz Tabulka 4: Popis programu č. 1. Záznam spektrofotometru byl uveden při vlnové délce 265 nm, při této vlnové délce má vitamín D absorpční maximum.



Obrázek 13: Analýza vitamínu D při koncentraci 50, 25 a 10  $\mu\text{M}$ .

Tabulka 6: Jednotlivé koncentrace vitamínu D a příslušné hodnoty absorbance.

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance - 1. měření	Absorbance - 2. měření
50	0,433	0,411
25	0,159	0,184
10	0,062	0,052

V grafu je vidět průběh analýzy při koncentraci 50, 25 a 10  $\mu\text{M}$ . Z grafu vyplývá, že při dávkování roztoku s vyšší koncentrací byla odezva vyšší. Se snižující se



koncentrací se snižuje i odezva. Při nejnižší koncentraci 10  $\mu\text{M}$  byla odezva velmi malá a byla překryta šumem. Absorbance je výrazná ve fázi analýzy, ve které dochází k dávkování vzorku na sorbent. Téměř veškerý vitamín D pouze protekl, nezachytil se na sorbentu a nemohlo dojít k jeho následné eluci.

## 5.2.2 Vývoj a optimalizace dávkovacího objemu vzorku

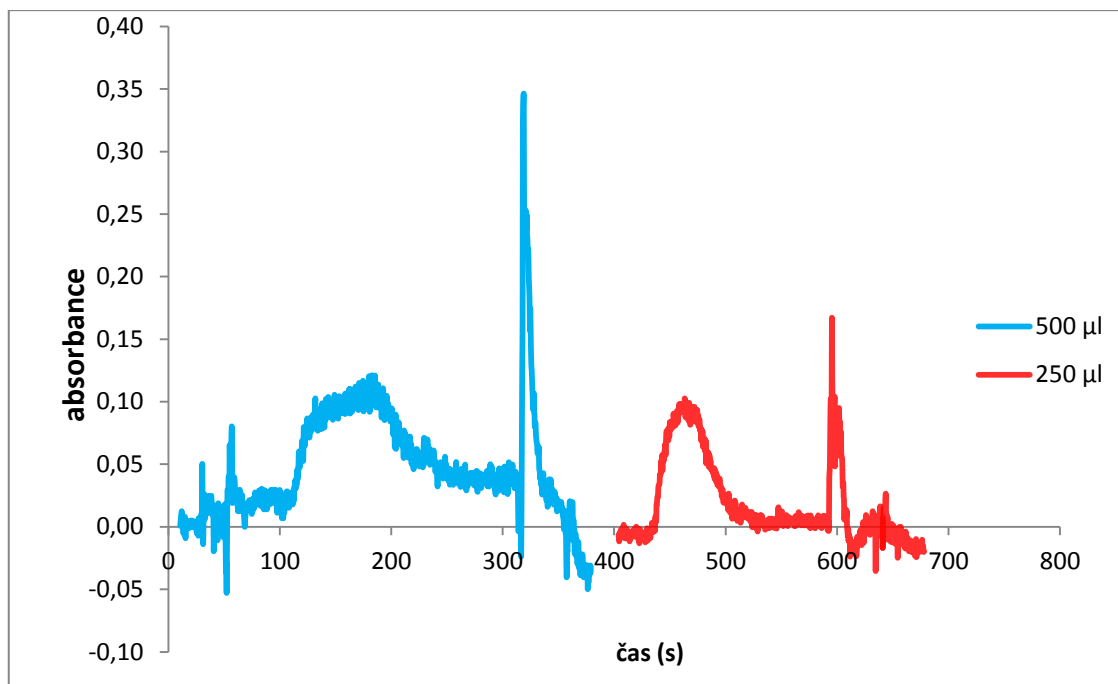
Při měření bylo zjištěno, že při aspiraci 100  $\mu\text{l}$  vzorku nedochází k jeho zachycení na sorbent a následné eluci, a měření nízkých koncentrací je nereprodukovatelné. Proto byla provedena analýza 25  $\mu\text{M}$  pracovního roztoku, přičemž se změnil podmínky v kroku č. 14 a 16. V grafu je porovnána analýza 25  $\mu\text{M}$  pracovního roztoku vitamínu D provedená za podmínek viz Tabulka 7 s analýzou provedenou za podmínek viz Tabulka 8. Analýzy se liší v dávkovaném objemu roztoku. První odezva patří 25  $\mu\text{M}$  roztoku dávkovaném při objemu 500  $\mu\text{l}$  a druhá odezva patří 25  $\mu\text{M}$  roztoku dávkovaném při objemu 250  $\mu\text{l}$ .

Tabulka 7: Změna č. 1 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
14.	pumpa	nasátí 500 $\mu\text{l}$ , rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$
16.	pumpa	vytlačení rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$

Tabulka 8: Změna č. 2 v programu č. 1.

Krok č.	Jednotka	Příkaz
14.	pumpa	nasátí 250 $\mu\text{l}$ , rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$
16.	pumpa	vytlačení rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$



Obrázek 14: Analýza 25µM vitamínu D při dávkovaném objemu 500 µl a 250 µl.

V grafu je vidět, že při vyšším dávkovaném objemu došlo ke zvýšení odezvy ve fázi eluce. Objem 500 µl je ideální, více vitamínu D se zachytí na sorbentu. Absorbance při nástřiku 500 µl má hodnotu 0,345, při nástřiku 250 µl má hodnotu 0,167.

Z výše uvedeného grafu vyplývá, že s vyšším dávkovacím objemem se zvyšuje i množství zachyceného vitamínu a odezva absorbance je vyšší a tedy i při nízkých koncentracích lze látku dobře identifikovat a výsledky pro stanovení nízkých koncentrací jsou reprodukovatelné. Při dávkovacím objemu 500 µl byla porovnána koncentrace 10 a 5 µM. Odezva byla vyšší při koncentraci 10 µM a při koncentraci 5 µM byla odezva nižší.

### 5.2.3 Vývoj průtokové rychlosti

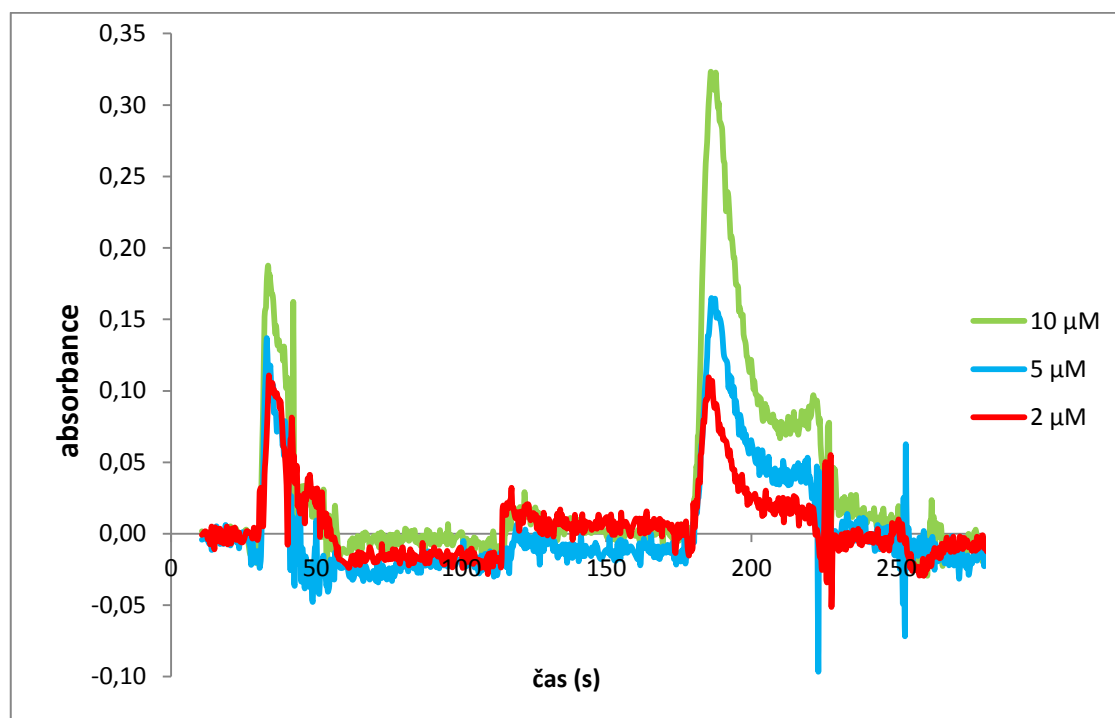
V průběhu analýzy bylo testováno několik průtokových rychlostí. Bylo provedeno 5 měření s průtokovou rychlostí 10, 5, 4, 3, a 2 µl/s. Záznamy grafů se lišily jen mírně, průtoková rychlost nemá podstatný vliv na výšku píku.

## 5.2.4 Optimalizace roztoku vitamínu D

Pro lepší identifikaci vitamínu D byla provedena analýza 10  $\mu\text{M}$  roztoku vitamínu D, do něhož byl přidán methanol. Nejdřív bylo přidáno 5 % methanolu, poté 10 %, 15 % a nakonec 50 % methanolu. Výsledky u roztoků s 5%, 10% a 15% methanolem se výrazně nelišily ve srovnání s roztokem vitamínu D o stejné koncentraci bez methanolu, absorbance u těchto roztoků měla průměrnou hodnotu 0,086.

U roztoku obsahujícího 50% methanol byla absorbance ve fázi dávkování vzorku i ve fázi eluce velmi vysoká. Proto byly testovány i koncentrace nižší než 10  $\mu\text{M}$ . Analýza byla provedena za podmínek, které jsou uvedeny viz Tabulka 7: Změna č. 1 v programu č. 1.

V následujícím grafu je vidět průběh analýzy pracovních roztoků vitamínu D při koncentraci 10, 5 a 2  $\mu\text{M}$ . Odezva se více projevila ve fázi eluce a je patrné, že u roztoku s vyšší koncentrací je vyšší odezva a s nižší koncentrací se odezva snižuje.

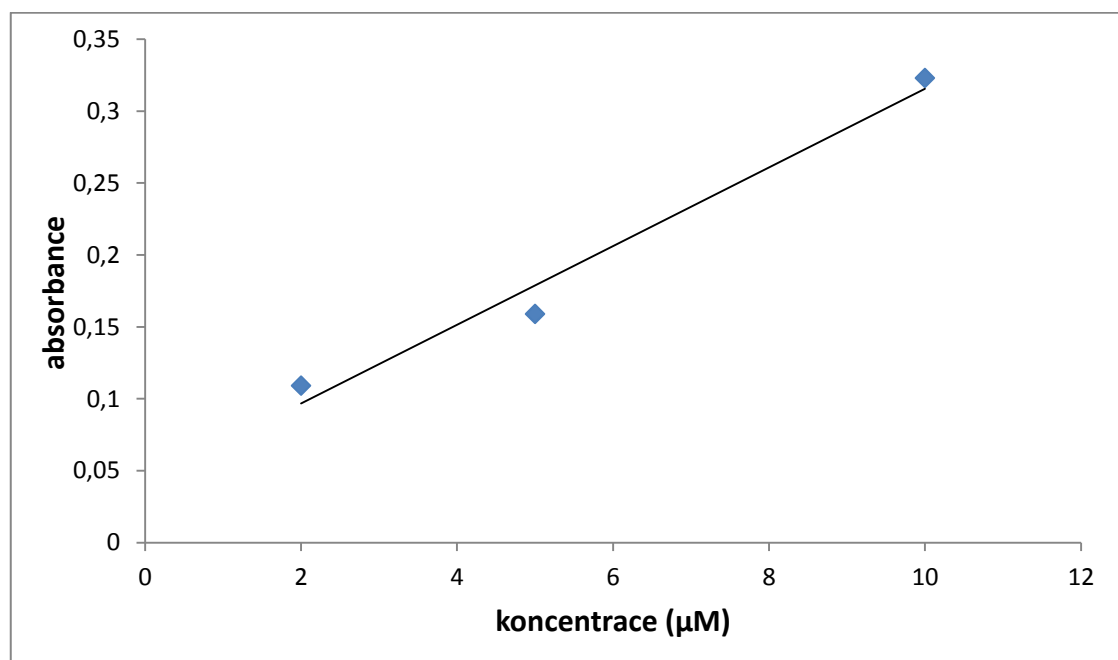


Obrázek 15: Analýza vitamínu D při koncentraci 10, 5 a 2  $\mu\text{M}$  v 50% methanolu.

U těchto 3 roztoků byla změřena lineární odezva absorbance a byla vytvořena kalibrační křivka. Korelační koeficient vyšel 0,9880 a reziduální odchylka 0,0244.

Tabulka 9: Data pro kalibrační křivku vitamínu D.

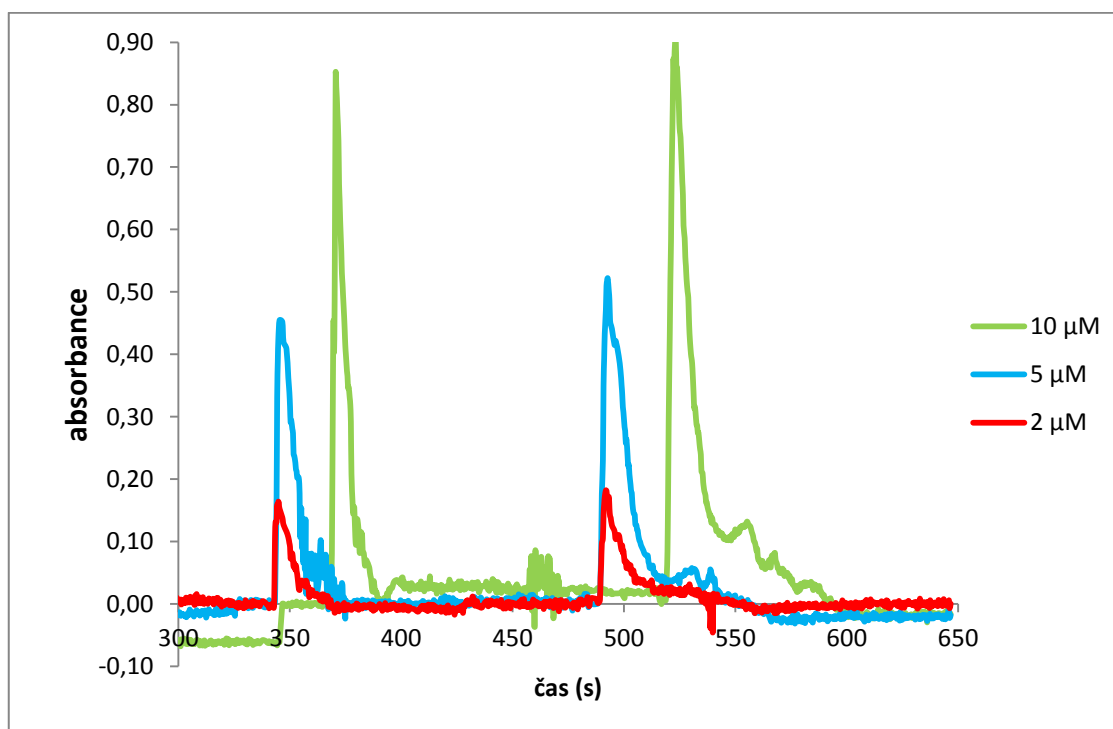
Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance	Počet bodů	n=3	
10	0,323	Směrnice	$k=0,0274$	$\pm 0,0043$
5	0,159	Absolutní člen	$q=0,0419$	$\pm 0,0281$
2	0,109	Korelační koeficient	$r=0,9880$	
		Reziduální odchylka	$s=0,0244$	



Obrázek 16: Kalibrační křivka roztoků vitamínu D.

## 5.3 Analýza vitamínu A

Za stejných podmínek jako vitamín D byla provedena i analýza vitamínu A. Byly testovány roztoky vitamínu A s postupně se snižující koncentrací 10, 5 a 2  $\mu\text{M}$  s obsahem 50% methanolu. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 325 nm, při níž má vitamín A absorpční maximum.



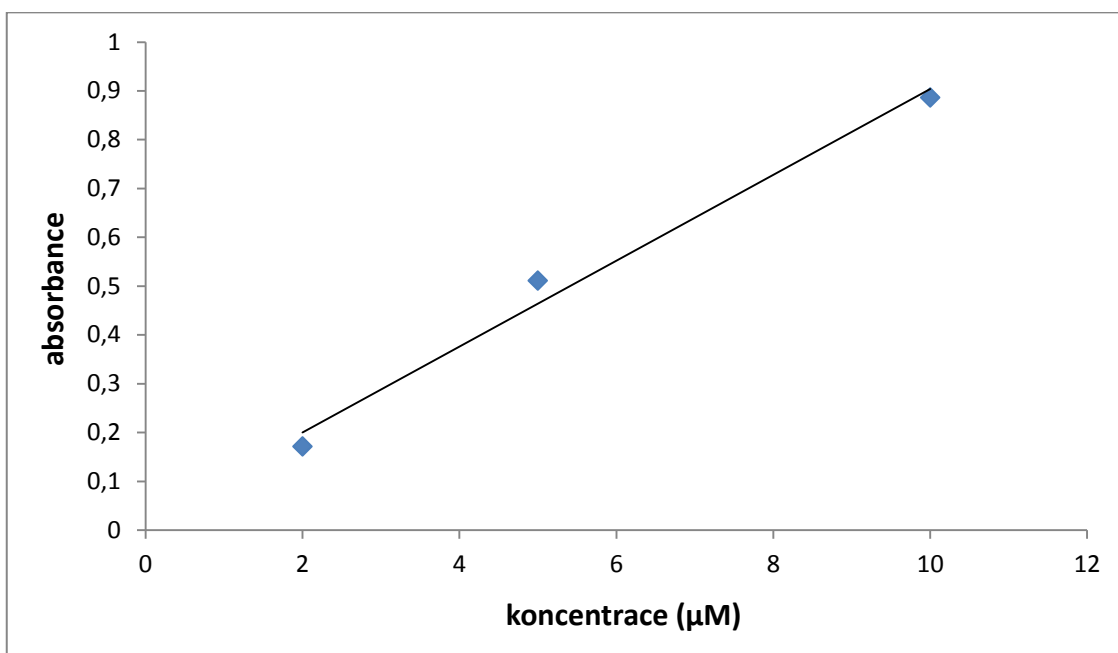
Obrázek 17: Analýza vitamínu A při koncentraci 10, 5 a 2  $\mu\text{M}$  v 50% methanolu.

Z analýzy vitamínu A vyplývá, že při vyšší koncentraci je vysoká odezva a při nižší se odezva snižuje. Analýza ve fázi dávkování vzorku a ve fázi eluce je stejná. Ve srovnání s vitamínem D má vitamín A vyšší absorbanci.

U roztoků těchto 3 koncentrací byla změřena lineární odezva a vytvořena kalibrační křivka. Korelační koeficient vyšel 0,9934 a reziduální odchylka 0,0581.

Tabulka 10: Data pro kalibrační křivku vitamínu A.

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance	Počet bodů	n=3	
10	0,886	<b>Směrnice</b>	$k=0,0879$	$\pm 0,0102$
5	0,511	<b>Absolutní člen</b>	$q=0,0245$	$\pm 0,0666$
2	0,171	<b>Korelační koeficient</b>	$r=0,9934$	
		<b>Reziduální odchylka</b>	$s=0,0581$	



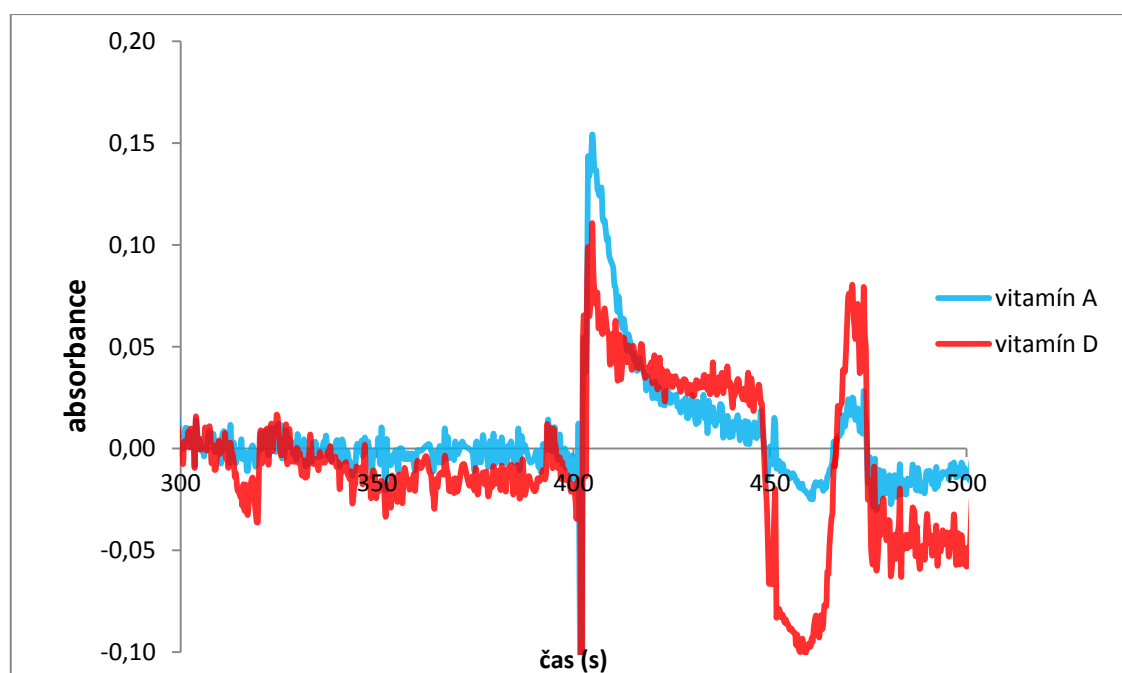
Obrázek 18: Kalibrační křivka roztoků vitamínu A.

## 5.4 Analýza směsi vitamínu D a A

V následujícím grafu je analýza vitamínu D při koncentraci 2  $\mu\text{M}$  a vitamínu A při koncentraci 1  $\mu\text{M}$ . Při této analýze byla provedena změna programu č. 1 v krocích č. 7 a č. 21, kdy docházelo k promytí kolony vyšším objemem promývací fáze a zároveň i v krocích č. 14 a 16, kdy dávkovaný objem roztoku byl 500  $\mu\text{l}$ . Vitamin A má ve srovnání s vitamínem D vyšší absorbanci ve fázi dávkování vzorku, kdežto ve fázi eluce má vitamin A absorbanci nižší. Výsledky analýzy jsou nepřesné.

Tabulka 11: Změna č. 3 v programu č. 1.

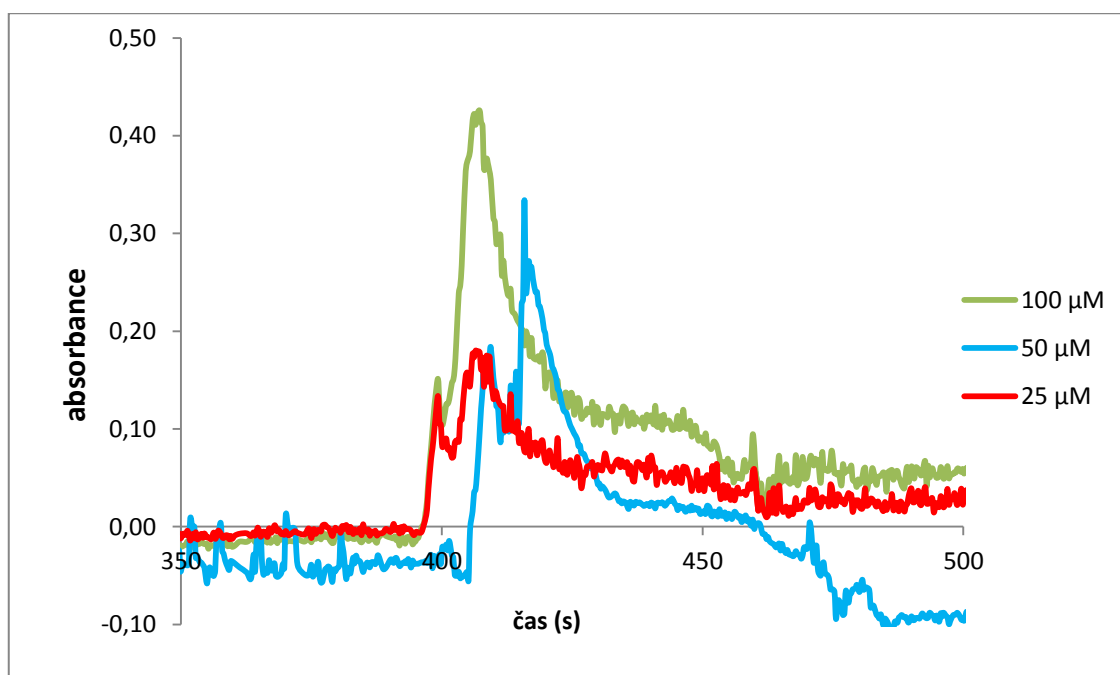
Krok č.	Jednotka	Příkaz
7.	pumpa	nasátí 400 $\mu\text{l}$ , rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$
14.	pumpa	nasátí 500 $\mu\text{l}$ , rychlostí 20 $\mu\text{l/s}$
16.	pumpa	vytlačení rychlostí 5 $\mu\text{l/s}$
21.	pumpa	nasátí 600 $\mu\text{l}$ , rychlostí 50 $\mu\text{l/s}$



Obrázek 19: Analýza 2  $\mu\text{M}$  vitamínu D a 1  $\mu\text{M}$  vitamínu A.

## 5.5 Analýza vitamínu E

Analýza vitamínu E probíhala při koncentracích 100, 50 a 25  $\mu\text{M}$  s 50% methanolem. Při měření nedošlo k žádné odezvě nejspíš v důsledku malé rozpustnosti vitamínu E v roztoku. Proto byl do roztoku přidán 80% methanol místo 50% a výsledky se zlepšily, docházelo k dávkování vzorku, jeho zachycení na koloně a následné eluci. Analýza byla provedena za podmínek viz Tabulka 7: Změna č. 1 v programu č. 1. Záznam spektrofotometru je uveden při vlnové délce 295 nm.



Obrázek 20: Analýza vitamínu E při koncentracích 100, 50 a 25  $\mu\text{M}$  v 80% methanolu.

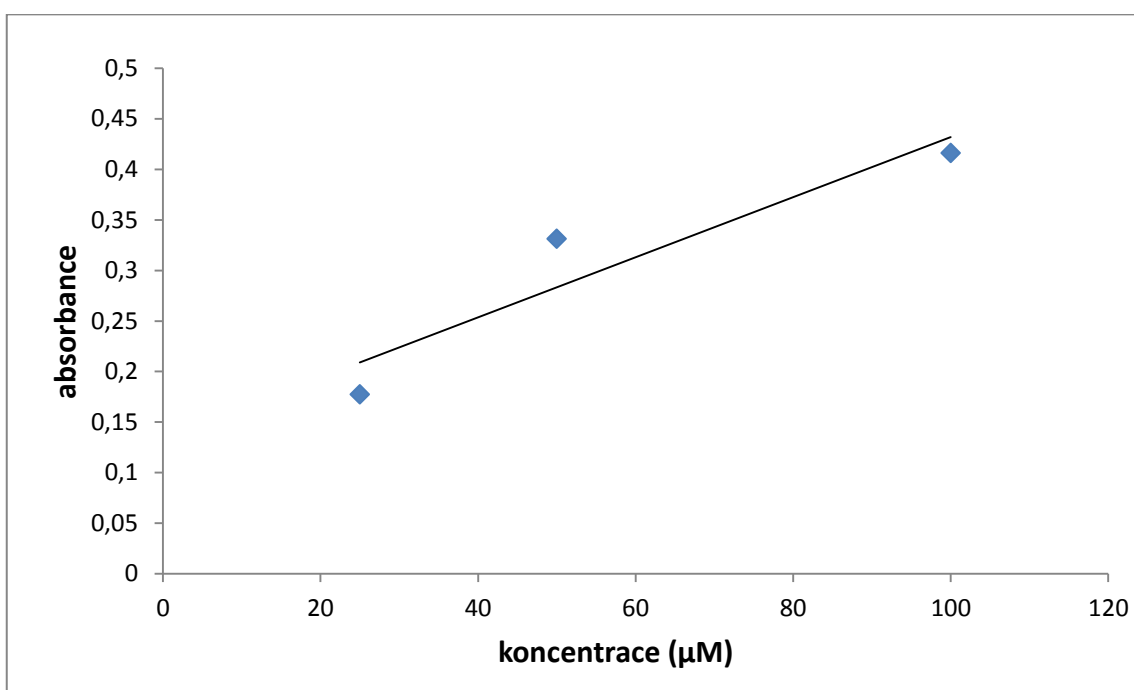
Z grafu se potvrdilo, že se snižující se koncentrací se snižuje i odezva.

U těchto 3 roztoků vitamínu E byla také změřena lineární odezva absorbance a vytvořena kalibrační křivka. Korelační koeficient vyšel 0,9375 a reziduální odchylka 0,0596.



Tabulka č. 12: Data pro kalibrační křivku vitamínu E.

Koncentrace ( $\mu\text{M}$ )	Absorbance	Počet bodů	n=3	
100	0,416	<b>Směrnice</b>	0,003	$\pm 0,0011$
50	0,331	<b>Absolutní člen</b>	0,1345	$\pm 0,0729$
25	0,177	<b>Korelační koeficient</b>	0,9375	
		<b>Reziduální odchylka</b>	0,0596	



Obrázek 21: Kalibrační křivka roztoků vitamínu E.

## 5.6 Analýza plazmy fortifikované vitamínem A, D a E

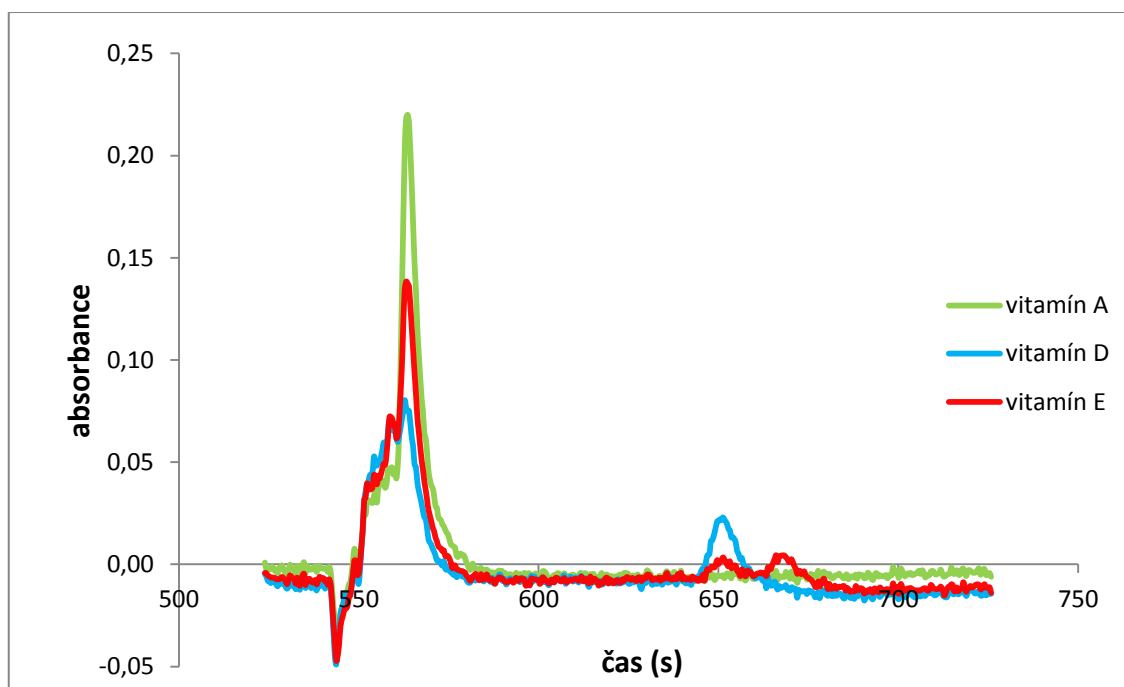
Po analýze standardu byla provedena analýza plazmy fortifikované 2,5  $\mu\text{M}$  vitamínem A, 5  $\mu\text{M}$  vitamínem D a 20  $\mu\text{M}$  vitamínem E. Analýza simulovala analýzu lidského vzorku. Měření proběhlo za podmínek viz Tabulka 11: Změna č. 3 v programu č. 1.

Při měření docházelo k ucpání MEPS a tvorbě bublin, proto byl eluát po extrakci odebírán a následně provedena analýza na SIC.

### 5.6.1 Analýza vzorku na SIC

Byla provedena analýza fortifikované plazmy pomocí metody SIC. Analýza byla provedena za podmínek viz Tabulka 5: Popis programu č. 2. Měření bylo provedeno při vlnových délkách 325 nm, 265 nm a 295 nm.

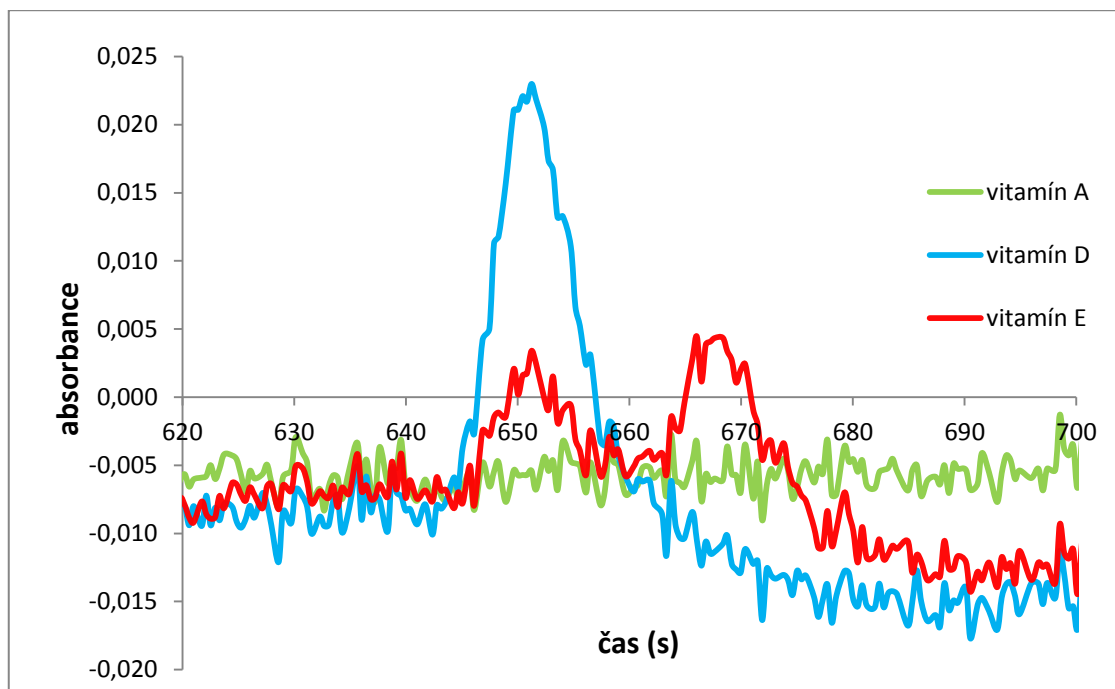
Podmínky SIC: kolona – Chromolith® Chromolith® FastGradient RP-18 endcapped 50 – 2 mm s předkolonou Chromolith® 5 – 2 mm, mobilní fáze 100% ACN, průtoková rychlost 10  $\mu\text{l sec}^{-1}$ , nástřik 100  $\mu\text{l}$ .



Obrázek 22: Analýza plazmy fortifikovaná 2,5  $\mu\text{M}$  vitamínem A, 5  $\mu\text{M}$  vitamínem D a 20  $\mu\text{M}$  vitamínem E.

Z grafu je patrné, že vitamín A má nejvyšší odezvu, jeho hodnota absorbance je 0,218. Vitamín D a E mají odezvy nízké.

V dalším grafu je pík vitamínu D a vitamínu E zvětšen.

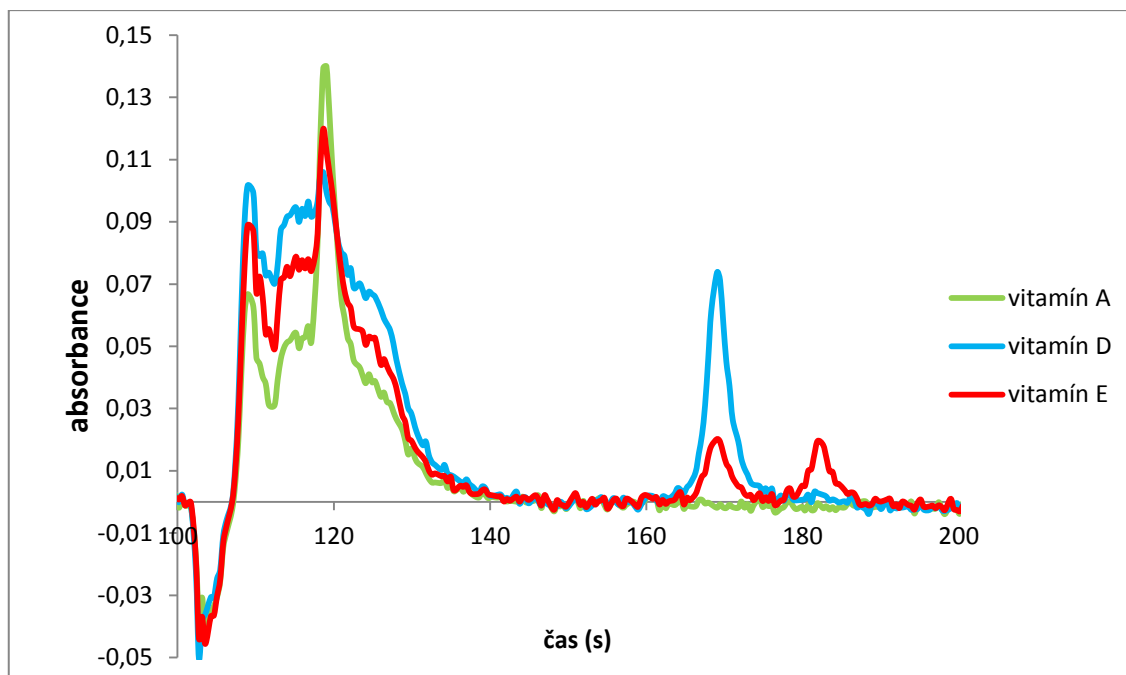


Obrázek 23: Zobrazení píků vitamínů D a E z fortifikované plazmy.

Po zvětšení je vidět, že hodnota absorbance vitamínu D je 0,021 a absorbance vitamínu E je 0,003. Malé odezvy vitamínů D a E jsou prokazatelné.

Zároveň byla provedena analýza pracovního roztoku směsi vitamínů A, D, E pomocí SIC metody. K analýze byly použity eluované vitamíny, které byly zachyceny do zkumavky-ependorf, a byly získány při extrakci SPE na přístroji SIA po promytí MEPS sorbentu ACN. Bylo ověřováno, zda opravdu byly vitamíny z plazmy zachyceny na sorbent a následně i eluovány. Po úpravě pracovního roztoku směsi vitamínů A, D, E (extrakce na MEPS) byla následně provedena separace na systému SIC. Analýza byla provedena za podmínek viz Tabulka 5: Popis programu č. 2 a to pouze s použitím kroků 21 až 34.

Koncentrace vitamínů jsou stejné jako koncentrace vitamínů ve fortifikované plazmě. Záznam spektrofotometru je při vlnových délkách 325, 265 a 295 nm.

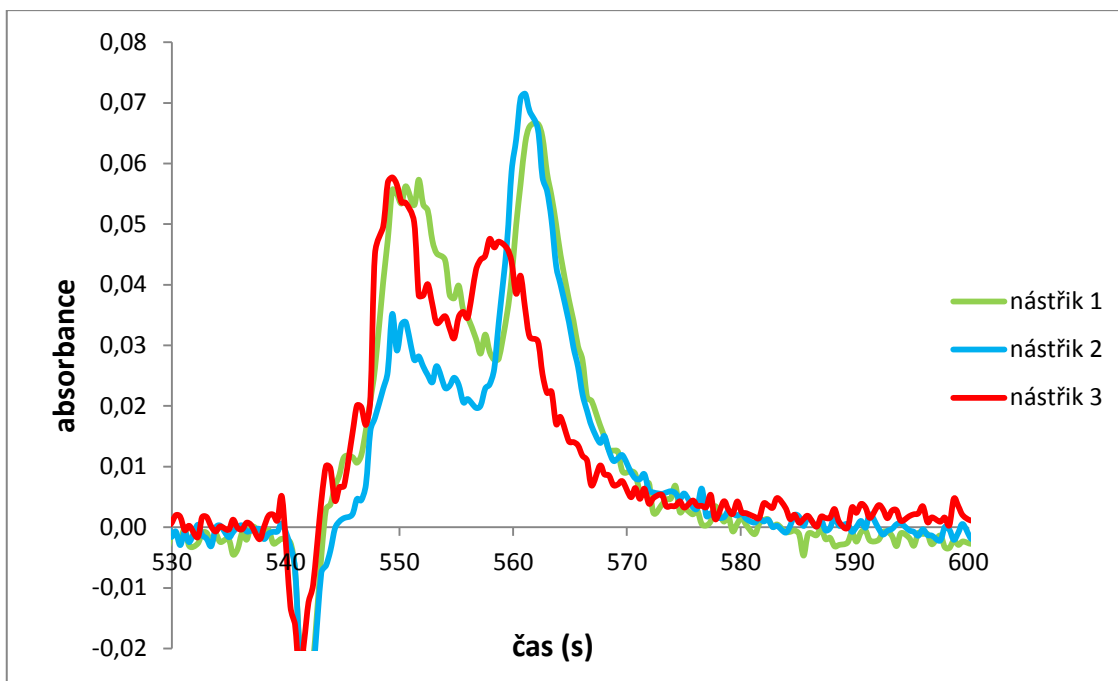


Obrázek 24: Analýza pracovního roztoku směsi vitamínů A, D, E na SIC.

Absorbance píku vitamínu A je 0,139, absorbance píku vitamínu D je 0,071 a absorbance píku vitamínu E je 0,019.

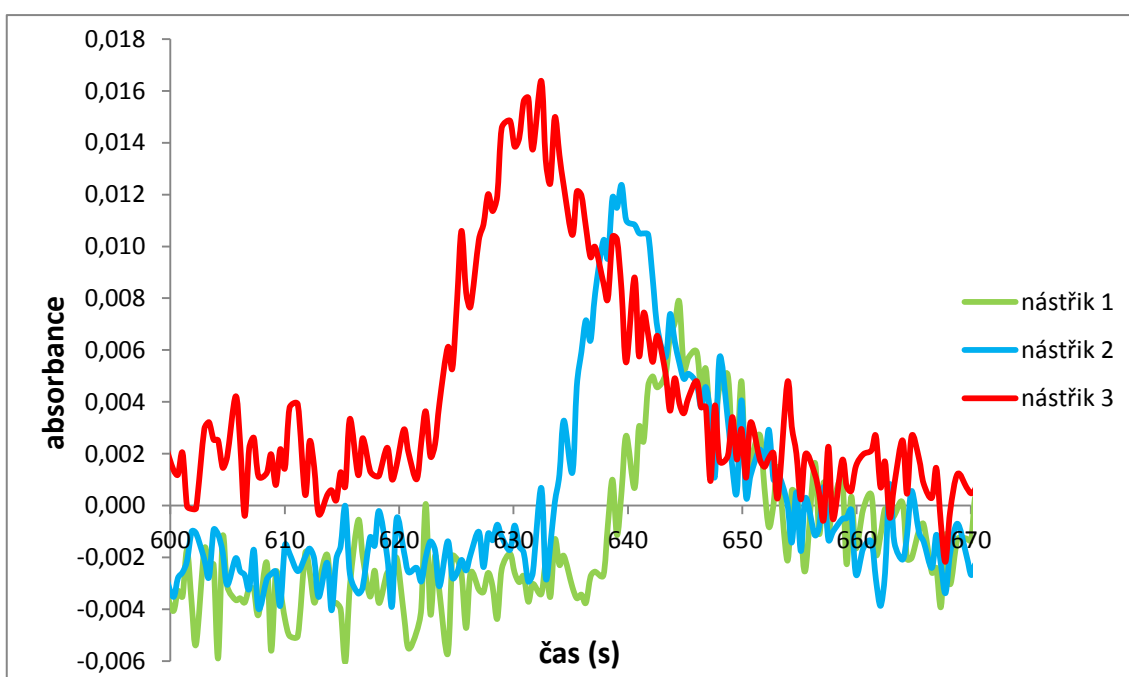
### 5.6.2 Opakovatelnost analýzy

U metody byla zkoušena opakovatelnost analýzy. Byla provedena opakovatelnost u plazmy fortifikované 2,5  $\mu\text{M}$  vitamínem A, 5  $\mu\text{M}$  vitamínem D a 20  $\mu\text{M}$  vitamínem E. Analýza proběhla za podmínek viz Tabulka 5: Popis programu č. 2. Následující 3 grafy ukazují opakovatelnost analýzy plazmy fortifikovanou směsí vitamínů A, D, a E, kdy 1. graf ukazuje opakovatelnost vitamínu A, 2. graf opakovatelnost vitamínu D a 3. graf opakovatelnost vitamínu E.



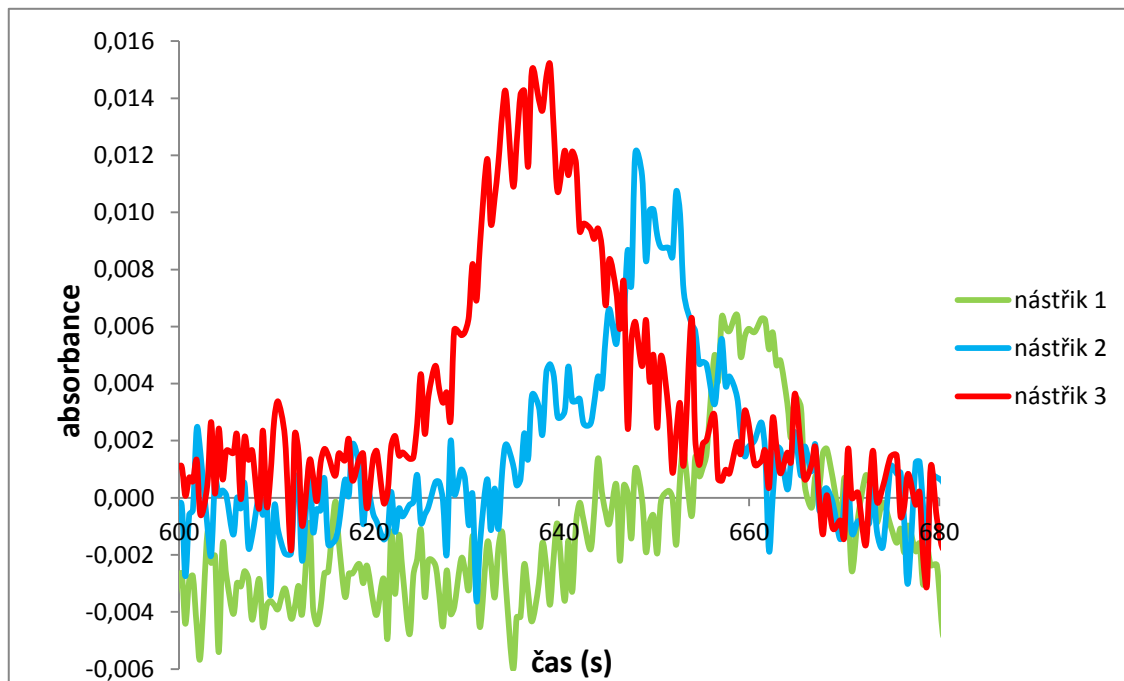
Obrázek 25: Opakovatelnost analýzy 2,5  $\mu\text{M}$  vitamínu A z fortifikované plazmy.

Z grafu je vidět, že 2 analýzy vitamínu A proběhly téměř stejně, ale třetí analýza se liší. Pro analýzu vitamínu A to je charakteristické, vždy dvě analýzy proběhnou stejně a třetí je odlišná. Nejčastěji se vytvoří bubliny, což zabrání dobré reprodukovatelnosti metody.



Obrázek 26: Opakovatelnost analýzy 5  $\mu\text{M}$  vitamínu D z fortifikované plazmy.

U 5  $\mu\text{M}$  vitamínu D z fortifikované plazmy je vidět, že analýzy se liší ve všech třech nástřicích jak v retenčním čase tak ve výšce píku, metoda není reprodukovatelná.



Obrázek 27: Opakovatelnost analýzy 20  $\mu\text{M}$  vitamínu E z fortifikované plazmy.

Opakovatelnost 20  $\mu\text{M}$  vitamínu E z fortifikované plazmy je podobná jako u vitamínu D. Analýza se při každém nástřiku liší, čímž je znemožněna reprodukovatelnost dané metody.

### 5.6.3 Stanovení výtěžnosti metody

Byla zjištěna efektivita extrakce jednotlivých vitamínů pomocí výtěžnosti.

Výtěžnost metody = (Absorbance vzorku/Absorbance standartu) \* 100 %.

Tabulka 13: Výsledky stanovení výtěžnosti vitamínu A, D, E.

	<b>Absorbance vzorku</b>	<b>Absorbance standardu</b>	<b>Výtěžnost (%)</b>
<b>Vitamín A</b>	0,218	0,139	156,83
<b>Vitamín D</b>	0,021	0,074	28,38
<b>Vitamín E</b>	0,003	0,019	15,79

Výtěžnost metody je u vitamínu A 156,83 %, u vitamínu D 28,38 %, u vitamínu E 15,79 %.

## 6. Diskuze

Vliv na průběh analýzy má koncentrace vitamínů. Při vyšších koncentracích je odezva detektoru vyšší, se snižující se koncentrací se odezva detektoru snižuje.

Na výsledky jednotlivých koncentrací pracovních roztoků má vliv dávkovací objem. Při nízkém dávkovacím objemu nedochází k dostatečné absorpci vitamínů na sorbent, vitamíny z velké části protečou. Při vysokých dávkovacích objemech dochází k navázání analytu na sorbent, je možné stanovení analytu i při nízké koncentraci a metoda je efektivní.

Průběh analýzy ovlivňuje pH nosného proudu. Optimální pH je kolem hodnoty 3. Další faktor ovlivňující průběh analýzy je složení rozpouštědla. Použitím 50% methanolu jako rozpouštědla se zajistí dobrá absorpce vitamínů i následná eluce a provedená analýza je efektivní, ale má malou výtěžnost pro vitamíny D a E.

Při analýze pomocí metody SIC byla zjišťována opakovatelnost plazmy fortifikované vitamíny A, D, E. Opakovatelnost proběhla při třech nástřicích. Analýza se při každém nástřiku lišila a to zabraňuje dobré reprodukovatelnosti metody.



## 7. Závěr

Byly sestaveny kalibrační křivky u jednotlivých vitamínů při třech koncentracích a měřena linearita odezvy. U vitamínu D v rozsahu koncentrací 10 – 2  $\mu\text{M}$  byl korelační koeficient 0,9880, u vitamínu A v rozsahu koncentrací 10 – 2  $\mu\text{M}$  byl korelační koeficient 0,9934 a u vitamínu E v rozsahu koncentrací 100 – 25  $\mu\text{M}$  byl korelační koeficient 0,9375. Nelze tvrdit, zda je metoda lineární či ne. Důvodem je použití pouze tří koncentrací, které nedávají přesné výsledky, optimální je tvořit kalibrační křivky z 5 koncentrací.

Při měření bylo potvrzeno, že analýzy jsou efektivní za použití vysokých koncentrací. V případě, že je prováděna analýza při nízkých koncentracích, je nutné pracovat s dávkovacím objemem minimálně 500  $\mu\text{l}$ .

Metoda byla optimalizována. Základem optimalizace bylo vytvoření správného programu analýzy. Stanoveny byly tyto optimální podmínky: Jako nosný proud byla použita zředěná kyselina octová o pH 3 a o objemu 200  $\mu\text{l}$ , sorbent byl aktivován 100% ACN. Vzorek byl připraven rozpuštěním ve směsi zředěné kyseliny octové a methanolu v poměru 1:1 a dává se objem 500  $\mu\text{l}$ . Nežádoucí látky jsou vymývány ze sorbentu promývacím roztokem o objemu 400  $\mu\text{l}$  a vzorek je extrahován 100% ACN. Průtoková rychlost během analýzy proběhla v rozmezí 5-100  $\mu\text{l/s}$ . K nasávání objemů vzorků a činidel se používají vyšší průtokové rychlosti, k dávkování objemů na sorbent dochází za nižších rychlostí. Důvodem je lepší zachycení vzorků na sorbent a následná eluce. Detekce byla měřena při vlnových délkách 325, 265 a 295 nm UV spektrofotometrem.

Byla provedena analýza plazmy fortifikovaná vitamíny A, D, E metodou MEPS. Analýza z důvodu ucpání MEPS a tvorby bublin dávala špatné výsledky, proto se přistoupilo k analýze pomocí sekvenční injekční chromatografie a byla zjišťována výtěžnost. Výtěžnost za optimálních podmínek byla u vitamínu A 156,83 %, u vitamínu D 28,38 % u vitamínu E 15,79 %. Výtěžnost u vitamínu A je vysoká, je to způsobeno nejspíš vlivem nedostatečného promytí kolony před další analýzou.

Práce byla zaměřena na automatizaci a miniaturizaci SPE a je experimentální. Je nutný její další vývoj a optimalizace. Výtěžnost metody je nízká u vitamínů D a E a metoda je nereprodukovatelná.

## 8. Seznam použité literatury

[1] DOSTÁL, J., a kol. *Lékařská chemie II: bioorganická chemie*. 2. zcela přepracované vydání. Brno: Masarykova Univerzita, 2007. 166 s. ISBN 978-80-210-3789-2.

[2] KOL. AUTORŮ. *Český lékopis 2009*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2009. 3968 s. ISBN 978-80-247-2994-7.

[3] MAROUNEK, M., BŘEZINA, P., ŠIMŮNEK, J. *Fyziologie a hygiena výživy*. 2. doplněné vydání. Vyškov: VVŠ PV Vyškov, 2003. 148 s. ISBN 80-7231-106-9.

[4] MOUREK, J. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2005. 204 s. ISBN 80-247-1190-7.

[5] LÜLLMAN, H., MOHR, K., WEHLING, M. *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. 2. české vydání. Praha: Grada Publishing, a.s., 2004. 728 s. ISBN 80-247-0836-1.

[6] *Vitamíny rozpustné v tucích* [online]. [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: [http://www.wikiskripta.eu/index.php/Vitaminy\\_rozpustn%C3%A9\\_v\\_tuc%C3%ADch](http://www.wikiskripta.eu/index.php/Vitaminy_rozpustn%C3%A9_v_tuc%C3%ADch).

[7] RŮŽIČKA, J. *Flow injection analysis* [CD-ROM]. 10/2009 [cit. 2012-03-26]. 4. vydání.

[8] PŘÍRODOVĚDNÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE, katedra analytické chemie. *Sekvenční injekční analýza (Stanovení obsahu dusitanů rivanolovou metodou)* [online]. [cit. 2012-04-01]. Dostupné z: [http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia\\_dus.pdf](http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/sia_dus.pdf).

[9] PASEKOVÁ, H., POLÁŠEK, M., SOLICH, P. Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy*, 1999, roč. 93, č. 6, s. 354-359.

- [10] ŠATINSKÝ, D., SOLICH, P., CHOCHOLOUŠ, P., KARLÍČEK, R. Monolithic Columns – a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, 2003, vol. 499, no. 1-2, s. 205-214.
- [11] PŘÍRODOVĚDNÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH. *Metody průtokové analýzy* [online]. [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: [http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane\\_kapitoly/prutok\\_anal.htm](http://users.prf.jcu.cz/sima/vybrane_kapitoly/prutok_anal.htm).
- [12] COUFAL, P. *Extrakce* [online]. [cit. 2012-04-07]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>.
- [13] KLOUDA, P. *Moderní analytické metody*. 2. upravené a doplněné vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.
- [14] SIGMA ALDRICH. *Extrakce na tuhou fázi* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>.
- [15] SIGMA ALDRICH. *Reversed-Phase Methodology* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/reversedphase-methodology.html>.
- [16] SIGMA ALDRICH. *Normal-Phase Methodology* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/normalphase-methodology.html>.
- [17] SIGMA ALDRICH. *Ionexchange Methodology* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/sample-preparation/spe/ionexchange-methodology.html>.
- [18] LEATHERHEAD FOOD RESEARCH. *Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins* [online]. [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>

- [19] SIGMA ALDRICH. *SPE Method Development for Pharmaceutical Bioanalysis* [online]. 30.3.2004 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Posters/t404060.Par.0001.File.tmp/t404060.pdf>.
- [20] JEŽKOVÁ, K., PAVLÍKOVÁ, P., DOBIÁŠ, P., ADAM, M., VENTURA, K. Analýza kyseliny L-askorbové v nápojích s využitím techniky MEPS. *Chemické listy*, 2010, roč. 104, č. 13, s. 17-19.
- [21] GREYHOUND CHROMATOGRAPHY. *MEPS – Micro Extraction by Packed Sorbent* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.greyhoundchrom.com/pdf/sge/sge-meps-gh.pdf>.
- [22] SGE ANALYTICAL SCIENCE. *MEPS* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://www.sge.com/products/meps>.
- [23] CHROMSERVIS. *Micro Extraction by Packed Sorbent (MEPS)* [online]. [cit. 2012-04-14]. Dostupné z: <http://chromservis.cz/item/micro-extraction-by-packed-sorbent-meps/category/meps>.
- [24] HORÁK, T., ČULÍK, J., JURKOVÁ, M., ČEJKA, P., KELLNER, V., DVOŘÁK, J., HAŠKOVÁ, D. MEPS a jeho použití při přípravě vzorků v pivovarské analytice. *Kvasný průmysl*, 2011, roč. 57, č. 9, s. 326-329.
- [25] VLČKOVÁ, H., SOLICHOVÁ, D., BLÁHA, M., SOLICH, P., NOVÁKOVÁ, L. Microextraction by packed sorbent as sample preparation step for atorvastatin and its metabolites in biological samples – Critical evaluation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 55, no. 2, s. 301-308.
- [26] CHOCHOLOUŠ, P., SOLICH, P., ŠATÍNSKÝ, D. An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 600, no. 1-2, s. 129-135.

[27] ŠATÍNSKÝ, D., HUCLOVÁ, J., SOLICH, P., KARLÍČEK, R. Reversed-phase porous silica rods, an alternative approach to high-performance liquid chromatographic separation using the sequential injection chromatography technique. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1015, no. 1-2, s. 239-244.

[28] ŠVEC, F. Monolitické stacionární fáze pro HPLC. *Chemické listy*, 2004, roč. 98, č. 5, s. 232-238.

[29] CHROMSERVIS. *Fáze ONYX* [online]. [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: <http://chromservis.cz/item/ONYX-phase?lang=CZ>.

[30] CHOCHOLOUŠ, P., ŠATÍNSKÝ, D., SKLENÁŘOVÁ, H., SOLICH, P. Two-column Sequential Injection Chromatography - New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2010, vol. 668, no. 1, s. 61-66.

[31] *Monolitické kolony* [online]. [cit. 2012-04-24]. Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Teorie/monolitic_columns.htm).