

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Nesilikagelové materiály v analýze léčiv I.

Diplomová práce

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

Hradec Králové 2014

Markéta Nezvedová

Na tomto místě bych ráda poděkovala PharmDr. Radimovi Kučerovi, Ph.D. a Mgr. Michalovi Klivickému za odbornou pomoc, cenné rady a připomínky při zpracování mé diplomové práce. Děkuji za jejich čas a ochotu mi kdykoli vyjít vstříc. Experimentální část byla podpořena Univerzitou Karlovou v Praze v rámci projektu GAUK 631612. Velký dík patří i mé rodině, především mé matce, za trpělivost a podporu během mého celého studia.

Prohlašuji, že tato diplomová práce je mým původním autorským dílem, jež jsem samostatně vypracovala. Literatura a ostatní zdroje, ze kterých jsem čerpala, jsou v práci řádně citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.

V Hradci Králové dne 15. 5. 2014

.....

Podpis

Obsah

1. Úvod.....	- 8 -
2. Teoretická část	- 9 -
2.1 Přehled metod používaných pro přípravu vzorku	- 9 -
2.2 Extrakce na pevné fázi – Solid-Phase Extraction (SPE).....	- 13 -
2.3 Průběh SPE.....	- 14 -
2.3.1 Přístrojové vybavení	- 14 -
2.3.2 Výběr kolony a sorbentu.....	- 15 -
2.3.3 Vlastní postup SPE	- 18 -
2.4 Sorbenty na bázi SiO ₂ a oxidů kovů.....	- 23 -
2.4.1 Silikagelové pevné fáze - SiO ₂	- 23 -
2.4.2 Pevné fáze na bázi oxidů kovů – TiO ₂	- 26 -
2.4.3 Pevné fáze na bázi oxidů kovů – ZrO ₂ ; ZrO ₂ -SAX	- 27 -
2.4.4 Mechanismy interakce oxidů kovů	- 30 -
3. Cíle.....	- 33 -
4. Experimentální část.....	- 34 -
4.1 Přístrojová technika.....	- 34 -
4.2 Chemikálie	- 35 -
4.3 Příprava zásobních roztoků	- 36 -
5. Výsledky a diskuze	- 38 -
5.1 Stacionární fáze na bázi TiO ₂ , ZrO ₂ – vzorek bez plazmy.....	- 39 -
5.1.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí.....	- 39 -
5.1.2 HILIC podmínky.....	- 43 -
5.2 Stacionární fáze na bázi ZrO ₂ , ZrO ₂ -SAX, TiO ₂ , SiO ₂ – plazma	- 48 -
5.2.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí.....	- 48 -
5.3 Stacionární fáze na bázi ZrO ₂ , ZrO ₂ -SAX, TiO ₂ - vzorek s plazmou.....	- 50 -
5.3.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí.....	- 50 -
5.3.2 HILIC podmínky.....	- 53 -
6. Závěr	- 56 -
7. Zdroje.....	- 57 -

Abstrakt

Nesilikagelové materiály v analýze léčiv I.

Diplomová práce

Markéta Nezvedová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové,

Katedra farmaceutické kontroly a kontroly léčiv

Heyrovského 1203, Hradec Králové.

Analýza vzorků nejrůznějšího původu je prováděna především pomocí chromatografických technik. Ty jsou samy o sobě považovány za nejcitlivější. Přesto je ale žádoucí si vzorek před vlastní analýzou upravit pomocí vhodné metody určené pro tento účel. Tyto postupy zbaví vzorku balastních látek, které by mohly rušit či interferovat při chromatografické analýze. Extrakce na pevné fázi je jednou z těchto metod, při níž se využívá k extrakci účinných látek z kapalného prostředí pevné fáze. Jedná se především o silikagelové sorbenty. Náš výzkum byl zaměřen na stacionární fáze na bázi oxidů zirkoničitého a titaničitého, které mají dle dostupných informací výrazný potenciál pro využití v oblasti analýzy. Jejich vlastnosti jsme testovali hlavně na kyselých analytech nejprve ve vzorku bez plazmy v módu s retencí polárních látek ve vodném prostředí a následně v HILIC podmínkách. Kyselé látky ve vodném prostředí byly z TiO_2 vymyty v promývací fázi, kdežto ze ZrO_2 byly analyty odstraněny až po eluci 5% NH_3 . HILIC podmínky zajistily na TiO_2 již dostatečnou extrakční výtěžnost většiny kyselin po eluci 50% ACN, na ZrO_2 bylo však dosaženo opět lepších výsledků. Extrakční schopnost těchto sorbentů jsme zkoušeli také na komplikovanějším biologickém vzorku především kyselých analytů s plazmou. Ve vodném prostředí vykazoval v našem případě nejlepších výsledků po eluci 5% NH_3 sorbent ZrO_2 -SAX, v HILIC podmínkách pro některé kyseliny naopak TiO_2 po eluci 50% ACN.

Klíčová slova: SPE, TiO_2 , ZrO_2

Abstract

Non-silica based materials in the drug analysis I.

Diploma thesis

Markéta Nezvedová

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

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Analysis

Heyrovského 1203, Hradec Králové.

The analysis of various samples is mostly carried out by chromatographic techniques, which are considered to be the most sensitive. However it is often necessary to pretreat samples before the analysis by an appropriate method in order to eliminate interferences. The solid-phase extraction is one of the techniques, which uses solid sorbent for extraction of active substances from liquid medium. Most of these materials are based on silica gel. Our research was focused on non-silica stationary phases based on zirconium dioxide and titanium dioxide. According to available information, these two materials have a significant potential for application in the area of analysis. We tested their properties on samples containing acidic analytes without plasma first in mode with retention of polar compound in aqueous environment, then in HILIC mode. Model acids were washed out from TiO₂ sorbent in aqueous medium, whereas they were released from ZrO₂ after elution by 5% NH₃. HILIC conditions led to higher recovery on the TiO₂ sorbent after elution by 50% ACN, however better results were again achieved on ZrO₂. We studied the extraction ability of these sorbents also for biologic samples containing plasma. In aqueous medium better results were achieved on the ZrO₂-SAX sorbent than on TiO₂ after elution by 5% NH₃. Only few acids were sufficiently retained on TiO₂ under HILIC conditions.

Keywords: SPE, TiO₂, ZrO₂

Seznam zkratek

ACN	Acetonitril
ATE	Atenolol
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High performance liquid chromatography)
IBU	Ibuprofen
LLE	Extrakce kapalina-kapalina (Liquid-liquid extraction)
MEPS	Mikroextrakce tuhým sorbentem (Microextraction packed sorbent)
MES	Kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
OHB	Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová
PA	Kyselina alkylfosfonová
PAB	Kyselina p-aminobenzoová
PHB	Kyselina p-hydroxybenzoová
PRO	Prokain
RP	Reverzní uspořádání fází
SA	Kyselina stearová
SAL	Kyselina salicylová
SPE	Extrakce na tuhé fázi (Solid phase extraction)
SBSE	Sorpční extrakce na míchací tyčince (Stir bar sorptive extraction)
SPME	Mikroextrakce na pevné fázi (Solid-phase microextraction)
TFA	Kyselina trifluoroctová
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
ZrO₂-SAX	ZrO ₂ -Silný měnič aniontů (ZrO ₂ -Strong anion exchanger)

1. Úvod

V mé diplomové práci jsme se zaměřili na výzkum nesilikagelových materiálů v analýze léčiv a jejich využití pro metodu extrakce na pevné fázi (Solid Phase Extraction, SPE). SPE je metoda, která slouží především pro úpravu biologického materiálu před vlastní analýzou. Umožňuje přesnou, rychlou a hlavně reprodukovatelnou možnost přípravy vzorku.

V dnešní době existuje nespočet různých pevných sorbentů, jejichž vývoj pokračuje a neustále jsou hledány nové s lepšími charakteristikami. Mezi nejčastěji využívané patří sorbenty silikagelové, které je možno díky jejich struktuře nejrůzněji modifikovat dle potřeb extrakce. Výzkum pevných fází pro SPE často vychází ze sorbentů určených pro HPLC, jež se navzájem liší velikostí zrn.

Naši práci jsme zaměřili na výzkum nesilikagelových materiálů na bázi oxidů kovů. V mém případě se jedná o sorbenty z TiO_2 , ZrO_2 a jeho modifikace pro iontově výměnnou extrakci ZrO_2 -SAX.

2. Teoretická část

2.1 Přehled metod používaných pro přípravu vzorku

Existuje mnoho druhů analytů, které je potřeba identifikovat, či kvantifikovat. Pro jejich přesnější hodnocení pomocí analytických metod je žádoucí si vzorky nejprve připravit pomocí vhodné metody. Časová náročnost následné analýzy je tak snížena. Výběr příslušné techniky závisí jak na vlastnostech matrice, tak na povaze látek v ní obsažených.

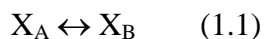
Nabízí se tedy metody pro (1) *extrakci netěkavých organických látek z tekuté fáze*: Extrakce kapalina-kapalina (LLE), Extrakce na pevné fázi (SPE) a její modifikace; (2) *extrakci netěkavých organických látek z pevné fáze*: Soxhletova extrakce, Extrakce ultrazvukem, Superkritická fluidní extrakce, Zrychlená extrakce rozpouštědlem, Mikrovlnná extrakce; (3) *extrakci těkavých organických látek z pevné a tekuté fáze*: Statická headspace extrakce, Dynamická headspace extrakce, Mikroextrakce na pevné fázi pro těkavé látky, Extrakce kapalina-kapalina (s jehlou o velkém objemu), Membránová extrakce.

Pro úplnost existují další upravené metody a postupy přípravy vzorku pro analýzu např. kovů a nukleových kyselin.

Tato kapitola se zaměřuje především na přehled technik pro kapalný vzorek s netěkavými organickými látkami, z nichž široce užívané jsou extrakce kapalina-kapalina (liquid-liquid extraction, LLE), extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE), mikroextrakce na pevné fázi (solid-phase microextraction, SPME) a poměrně nová sorpční extrakce na míchadle (stir bar sorptive extraction, SBSE) a mikroextrakce tuhým sorbentem (microextraction in packed syringe, MEPS).

Obecně se jedná o postupy, kde jsou matrice obsahující analyt vzájemně nemísitelné s extrakční fází. Pro správné provedení jakékoli techniky využívající principu extrakce jsou tedy důležité vlastnosti jak vybrané fáze určené k separaci, tak analyzované látky a kapaliny, ve které je rozpuštěna. Mezi tyto vlastnosti patří především acidobazicitu, polaritu, rozpustnost, náboj a pH. Vhodně zvolené podmínky zajistí přechod látky z jedné fáze do druhé (1, 2, 3).

Při separaci dochází k distribuci rozpuštěné chemické složky X mezi kapalnou fází A a extrakční fází B. Extrahovaný analyt je poté získáván z fáze B a hodnocen pomocí zvolené metody instrumentální analýzy. Rovnováhu, která se ustavuje mezi fázemi A a B, popisuje následující rovnice:



Z rovnice (1.1) pak vychází dle Nernstova zákona rovnovážná distribuční konstanta K_D :

$$K_D = [X]_B / [X]_A \quad (1.2)$$

Závorky vyjadřují koncentraci látky X v obou fázích při konstantní teplotě.

Úkolem je tedy optimalizovat extrakční podmínky tak, aby byla distribuční rovnováha posunuta doprava a výsledná hodnota K_D (1.2) byla co nejvyšší.

U metody **LLE** jsou obě nemísitelné fáze kapalné, obvykle je jedna z nich vodná, druhá organická. Analyt přítomný ve vodné složce musí být rozpustný i v organické fázi použité ve funkci extrakčního média. Extrakce analyzované látky z vodného prostředí pomocí organického činidla je využívána již od začátku 19. století. Přednosti tohoto postupu spočívají v dobré výtěžnosti, reprodukovatelnosti a jednoduchosti provedení. Výsledný extrakt analytů má ještě tu výhodu, že zde, v organickém prostředí, neexistuje riziko kontaminace mikroorganismy. Na druhé straně však stojí někdy příliš velké objemy činidel nutných pro extrakci, možná tvorba emulzí analytu s organickými rozpouštědly a především obtížná automatizace metody. Tyto nedostatky vedly k rozvoji dalších separačních technik jako je SPE a různých modifikací tohoto postupu (1, 2).

Na závěr je nutno uvést techniku **deproteinace**. Slouží k vyčištění biologického vzorku od přítomných bílkovin. Obecně se jedná o rychlejší postup než v případě LLE, avšak má i své nevýhody – v některých případech je pozorována nižší analytická výtěžnost kvůli možnému navázání analytů na proteinech. Separace může být provedena dvěma způsoby, a to *precipitací* pomocí chemického činidla (kyselina trichlorooctová, síran zinečnatý, etanol, atd.), nebo *ultrafiltrací* (1, 4, 5).

Postup při **SPE** využívá k extrakci tuhou složku, zatímco analyt je rozpuštěn v kapalném prostředí. Současné trendy v rozvoji této metody se zabývají především možnostmi miniaturizace, které obecně snižují nutné objemy vzorků a spotřebu rozpouštědel. Výsledkem jsou tato provedení:

SPE s využitím extrakčních disků

Zařízení využívá místo kolonek naplněných sorbentem extrakční disky. Disky jsou vyráběny z teflonových fibril nebo skleněných vláken s obsahem příslušného sorbentu v poměru materiál disku : sorbent 1 : 9. Tomuto provedení jsou často předřazeny filtry zabraňující ucpání disků, např. makromolekulami (1).

Mikroextrakce tuhým sorbentem (MEPS)

Prakticky se jedná o přímou miniaturizaci samotné SPE metody. Aparatura sestává z mikrostříkačky, která představuje miniaturní kolonku se sorbentem. Vzorek je natažen do stříkačky, poté se natáhne organické rozpouštědlo a eluce se provádí již přímo do dávkovače HPLC či GC (1, 3).

Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME)

Izolace analytu probíhá pomocí tuhé fáze prakticky bez použití rozpouštědel. Aparatura sestává z duté ocelové jehly, ve které je umístěno křemenné vlákno s naneseným sorbentem. Jehlou se propíchně septum vialky s roztokem analytu, do kterého se vypustí vlákno se sorbentem. Po adsorbci látky se vlákno zasune zpět do jehly a vzorek je již připraven k analýze pomocí plynové či kapalinové chromatografie (1, 2).

Sorpční extrakce na míchadle (SBSE)

Princip separace je podobný jako u SPME, zde však za použití míchadla. Jeho vnitřek z nerezové oceli je umístěn ve skleněném plášti, na kterém je nanesen sorbent. Tyčinka je opět ponořena do připraveného vzorku po nutnou dobu do ustavení rovnováhy (1, 2).

Porovnat nejvíce používané metody (Tab. 1), LLE, SPE, SPME a SBSE, lze na základě dvou vlastností, kterými jsou:

- 1.) Množství analytu, který je zpětně získán (extrahován). Jedná se o výtěžnost, extrakční účinnost celé soustavy, jež by měla být >90 %. Z tohoto hlediska, které také souvisí s K_D , jsou porovnávané techniky hodnoceny jako kompletní či nekompletní.
- 2.) Hodnota K_D (1.3) pro analyt v průběhu ustavení rovnováhy. Rovnovážná konstanta blíží se nekonečnu značí při procesu stav nerovnováhy. K_D hodnoty pro jednotlivé postupy se snižují v řadě:

$$K_{D(\text{SPE})} > K_{D(\text{LLE})} \approx K_{D(\text{SBSE})} > K_{D(\text{SPME})} \quad (1.3)$$

Tab. 1. Srovnání metod ⁽²¹⁾

Metoda	Rovnováha	Výtěžnost
SPE	ne	kompletní
LLE	ano	kompletní
SBSE	ano	nekompletní
SPME	ano	nekompletní

Metody jsou seřazeny dle hodnot K_D (1.3)

Abychom dosáhli u LLE techniky (při které dochází k ustavení rovnováhy) kompletní výtěžnosti, je zapotřebí provést vícenásobnou extrakci, což činí tento postup pracnějším. Extrakční kapacita u SBSE je vyšší než při SPME, zároveň ale nižší než u LLE. Dostatečná kapacita nutná pro kvantitativní přechod analytu do tuhé fáze závisí nejen na hodnotě K_D , ale také na množství sorbentu. Pro SBSE je typické použití celkově více pevné fáze než při SPME, proto tento postup zaručuje vyšší výtěžnost. Využití metod typu SPE je značné nejen ve farmacii, ale také v oblasti ochrany životního prostředí (2).

2.2 Extrakce na pevné fázi – Solid-Phase Extraction (SPE)

Extrakce na pevné fázi je jedna z nejčastěji využívaných technik pro úpravu vzorku. Jde o rychlou metodu vhodnou především k zakoncentrování středně těžkých a netěkavých organických látek z vodného prostředí. Používá se především pro eliminaci nežádoucích látek či matrice, která není vždy slučitelná s analytickým chromatografickým systémem. Tím se zvyšuje přesnost následné analýzy. Příkladem budiž studie, ve které byla SPE metoda použita za účelem snížení komplexnosti vzorku. Tím byl rostlinný extrakt, ve kterém měly být následně analyzovány cukry, jež se nacházejí v nukleotidech. Význam SPE oproti LLE stále roste (1, 6, 7, 8, 9).

Do roku 1977 byla tato metoda známa pouze v teoretické rovině. Nové poznatky z oblasti pevných fází zapříčinily další rozvoj této techniky, který pokračuje dodnes. V roce 1977 představila společnost Waters Corporation komerčně dostupné připravené kolony s vázanou silikagelovou fází. Termínem solid-phase extraction tuto metodu poprvé nazvali zaměstnanci z J.T. Baker Chemical Company (2).

Postup využívá extrakci tuhými fázemi z fáze kapalné. Z toho plyne, že ke správnému zachycení analytu, musí tento vykazovat vyšší afinitu k pevné fázi než ke kapalné, ve které je rozpuštěn. Ze sorbentu jsou žádané složky elucí příslušným rozpouštědlem převedeny zpět do tekutého prostředí. Matematicky vyjádřeno, silná afinita odpovídá vysokým hodnotám K_D (2.2), jelikož koncentrace analytu v pevné fázi je vyšší než v kapalné. Rovnovážná konstanta blízká se v tomto případě nekonečnu znamená, že zde v průběhu retence dochází k úplné kumulaci analytu v pevné fázi. Naopak hodnoty K_D se přibližují nule v průběhu eluce analyzovaných složek.

Nejdříve byly sorbenty některými analytiky mylně považovány za filtry a SPE proces jako filtrace. Domněnka vznikla na základě faktu, že většina tuhých fází užívaných pro SPE jsou porózního charakteru. Molekuly analytu přítomné v homogenním roztoku vzorku však nejsou filtrovány, ale dochází k jejich interakci s pevnou fází principem sorpce. Nicméně částice sorbentu se mohou v určité situaci chovat jako tzv. hloubkové filtry vůči složkám, jež ve vzorku tvoří homogenní roztok. Tyto komponenty tak mohou být zachyceny póry tuhé fáze. Tento efekt je obecně nežádoucí, jelikož zde hrozí, že dojde k ucpání sorbentu. Vznik tohoto problémového jevu závisí všeobecně na koncentraci, druhu a velikosti částic ve vzorku, velikosti pórů sorbentu a na ploše povrchu pevné fáze. Zde je na místě před vlastním provedením SPE

podrobit vzorek tzv. předfiltraci. K tomuto účelu jsou určeny filtry ze skleněných vláken, které jsou díky svému složení inertní k analytu, zatímco biologické kontaminanty jsou zadrženy. Částice o průměru $\geq 1 \mu\text{m}$ mají tendenci díky působení gravitace sedimentovat. V souvislosti s přípravou vzorku pro metodu SPE pomocí filtrace se používají filtry s otvory o velikostech $0,7 \mu\text{m}$, $0,45 \mu\text{m}$ nebo $0,22 \mu\text{m}$. Zachycený materiál je možné následně také analyzovat a stanovit tak množství vázaného analytu (2, 9, 10).

Výhody této metody spočívají jak ve snížení spotřeby organických rozpouštědel, tak ve snížení potřebného množství analytu. Tento postup je výhodný i z hlediska výsledného zakoncentrování zředěných nebo značně objemných vzorků. Jedná se tedy o metodu ekologičtější a zároveň i ekonomičtější. Samozřejmostí je i online spojení, tedy možnost automatizace, s analytickým systémem, např. HPLC. Technika SPE umožňuje také uchovávat vzorek pro pozdější analýzu ve stavu naadsorbované látky na pevném sorbentu umístěném v extrakční kolonce. Při správném postupu jde o reprodukovatelnou metodu s dobrou výtěžností (1, 9).

2.3 Průběh SPE

2.3.1 Přístrojové vybavení

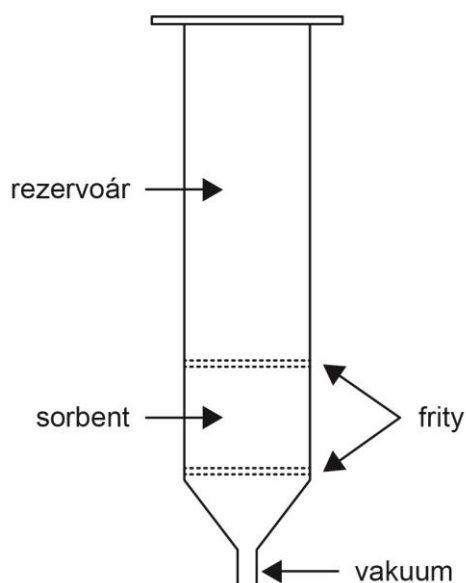
Aparatura pro SPE se skládá z kolonky obsahující sorbent, která je ve spojení se zařízením, jenž zajistí tvorbu tlaku pro rychlejší průběh extrakce. Nejčastěji se využívá podtlaku. K dispozici jsou extrakční vakuová zařízení pro extrakci na několika kolonkách zároveň v různém provedení. Klasická konstrukce je znázorněna na Obr. 1. Systémy generující podtlak jsou např. vodní vývěva či přímo vakuové čerpadlo. Součástí je samozřejmě i tlakoměr. Průběh extrakce lze ovlivňovat na každé kolonce zvlášť díky přítomným ventilům. Uvnitř aparatury jsou prostory pro zkumavky jímající extrakt procházející teflonovými jehlami, jež jsou vůči vzorku inertní (1, 6, 11).



Obr. 1. Aparatura pro SPE (12)

2.3.2 Výběr kolonky a sorbentu

Samotnému postupu předchází výběr kolonky a typu sorbentu. Ve většině případů se tzv. extrakční (SPE) kolonky dodávají již připravené výrobcem. Komerčně vyráběné kolony jsou homogennější. Je možné si ale také samotný materiál zakoupit a kolonky si připravit na místě. Kolonky, vyrobené z polypropylenu nebo ze skla, jsou opatřeny dvěma porózními fritami, jež jsou zhotovené z polyethylenu, nerezové oceli či teflonu. Mezi těmito fritami se nachází vybraný sorbent (Obr. 2) (1, 2, 9).



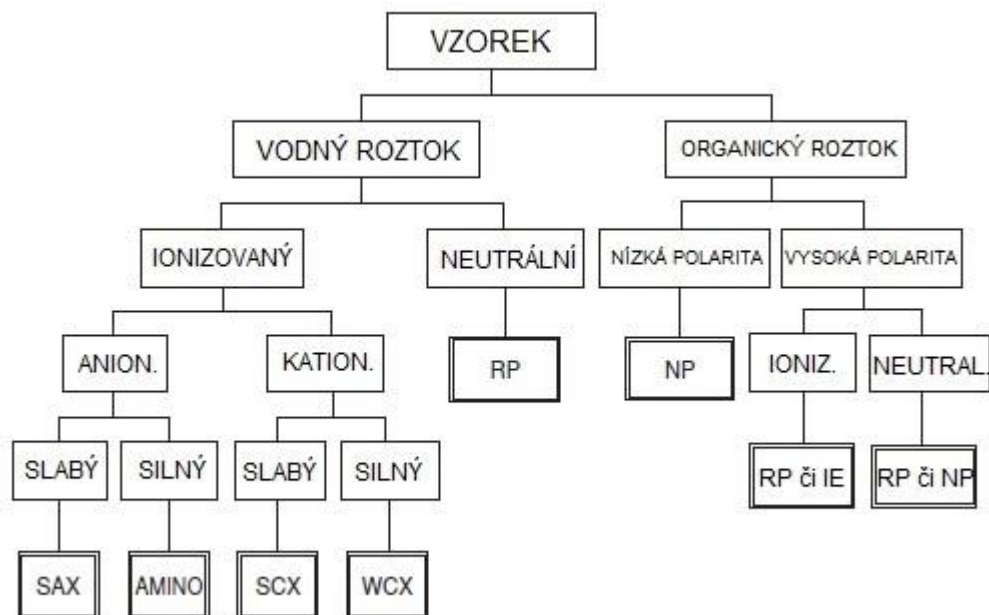
Obr. 2. Schéma SPE kolonky (13)

Velikost kolonky je závislá na velikosti objemu vzorku. Obecně platí, že čím větší množství vzorku, tím větší je třeba kolonka pro extrakci. Konkrétní údaje uvádí Tab. 2:

Tab. 2. Výběr velikosti kolonky (6, 9)

Objem vzorku	Velikost kolonky	Množství sorbentu
<1 ml	1 ml	50 mg / 100 mg
1 ml – 250ml; pomalá rychlost extrakce	3 ml	500 mg
1 ml – 250 ml; rychlá extrakce	6 ml	500 mg
10 ml – 250 ml velká kapacita sorbentu	12, 20 nebo 60 ml	1, 2, 10 g
<1 l; pomalá rychlost extrakce	12,20 nebo 60 ml	1, 2, 10 g

Druh pevné fáze je zvolen dle vlastností látky, která má být separována. Znalost struktury analytu je zásadní pro efektivní průběh extrakce. Je třeba si položit otázky ohledně mísitelnosti analytu s vodou či s organickými roztoky, zda se jedná o vzorek neutrální, s nábojem, závislý na pH či nikoli, hydrofilní, hydrofóbní, polární, středně polární či nepolární. Volbu vhodného sorbentu přehledně znázorňuje schéma (Obr. 3).



Obr. 3. Výběr vhodného sorbentu pro izolaci organických složek z roztoku. (2)

SAX, silný měnič aniontů; SCX, silný měnič kationtů; WCX, slabý měnič kationtů; RP, reverzní uspořádání fází; NP, normální uspořádání fází; IE, extrakce na základě mechanismu iontové výměny.

Sorbenty u této techniky mají velikost zrn větší (Tab. 3), než je tomu u pevných fází pro HPLC, tudíž se zde pracuje s nižšími tlaky. V současnosti se mezi typické SPE sorbenty řadí jak polární materiály jako oxid křemičitý, oxid hlinitý a oxid hořečnatý, tak nepolární fáze jako chemicky vázaný silikagel, polystyrenové sorbenty či grafitizovaný neporézní uhlík (1, 14, 15).

Tab. 3. Přehled SPE sorbentů a jejich vlastností (16)

Sorbent	Typ modifikace	Plocha povrchu [m ² /g]	Velikost částic [μm]	Velikost pórů [Å]	Mechanismus retence
SiO ₂	C18 - polymerní	450-550	50-60	65-75	RP
SiO ₂	C18 - monomerní	280-320	50-60	120-140	RP
SiO ₂	C8	450-550	50-60	60-75	RP
SiO ₂	fenyl	450-550	50-60	60-75	RP
SiO ₂	CN, cyanobutyl	450-550	50-60	60-75	RP+NP
SiO ₂	NH ₂ , aminopropyl	450-550	50-60	60-75	NP+IE
SiO ₂	SCX	450-550	50-60	60-75	IE
SiO ₂	SAX	450-550	50-60	60-75	IE
SiO ₂	kyselá, neutrální	250-600	50-60	60-75	NP
Al ₂ O ₃	kyselá, neutrální, zásaditá	100-150	50-300	100-120	NP
MgO	bez modifikace	300-600	50-200	60-80	NP
Polymer (SDB)	bez modifikace	500-1000	75-150	50-300	RP

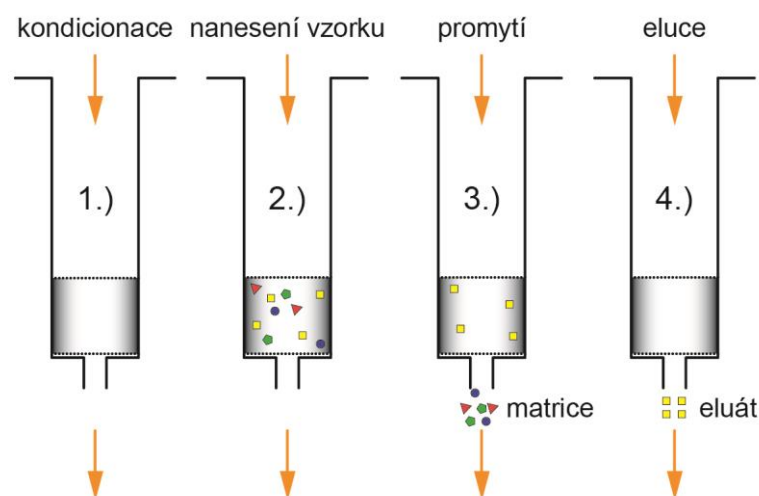
SCX, silný měnič kationtů s vázanou fenylsulfonovou kyselinou; SAX, silný měnič kationtů s navázaným trimethylpropylammonium chloridem; SDB, polystyrendivinybenzen; RP, reverzní uspořádání fází; NP, normální uspořádání fází; IE, extrakce na základě mechanismu iontové výměny.

Hmotnost zvoleného sorbentu je dána od očekávaného množství extrahovaných komponent ve vzorku. Toto množství by nemělo přesahovat 5 % hmotnosti pevné fáze. Například při použití 100 mg/1 ml SPE kolonky lze na tuto nanést maximálně 5 mg rozpuštěných analytů. Uvedené pravidlo platí pro reverzní a normální uspořádání fází. U extrakčních procesů založených na iontové výměně je potřeba počítat s kapacitou iontové výměny konkrétních sorbentů. Množství sorbentu dle velikosti kolonky a objemu vzorku znázorňuje tabulka (Tab. 2).

K obecným požadavkům na tuhé fáze patří jejich inertnost k analyzovaným látkám, nereaktivita a nerozpustnost v elučním činidle, dostatečná sorpční kapacita (1, 2, 6, 9).

2.3.3 Vlastní postup SPE

Obecně se SPE skládá ze čtyř kroků (Obr. 4): (1) aktivace sorbentu (kondicionace), (2) nanesení vzorku, (3) promytí kolonky a (4) vymytí analytu (eluze). Výjimky, kdy se postupuje s vynecháním některého z kroků, jsou popsány dále.



Obr. 4. Schéma postupu SPE (17)

1.) Aktivace sorbentu (kondicionace)

Při kondicionaci dochází k rozprostření řetězců pevné fáze pro lepší sorpci látky ve druhé fázi procesu. Již samotná aktivace je tedy také důležitá k zajištění vyšší účinnosti postupu. U reverzních fází (nepolární adsorbce) se v tomto kroku používá s vodou mísitelné organické rozpouštědlo (methanol, acetonitril). Vodnou fází, tj. vodou nebo pufrem, je poté nutné předcházející aktivační činidlo odstranit, aby nedocházelo k vysrážení bílkovin v případě následného nanesení vzorku s biologickým materiálem. U normálního módu (polární adsorbce) se provede kondicionace pomocí nepolárního organického činidla, např. hexanu. U sorbentů s mechanismem iontové výměny jsou též dány typy roztoků určených k aktivaci jejich povrchu. Obecně se v této fázi používá roztok, v němž je rozpuštěn analyt.

Množství činidla pro tuto fázi bývá 1 – 2 ml/100 mg sorbentu. V této fázi je důležité, aby nedošlo k vyschnutí navlhčeného sorbentu po nanesení daného činidla. Pokud k němu dojde, je potřeba celý proces pro danou kolonku zopakovat (1, 2).

2.) Nanesení vzorku

Průtok analytu extrakční kolonkou by měl být co nejpomalejší. U iontové výměny by nemělo dojít k překročení rychlosti 2 ml/min, u ostatních módů pak 5 ml/min (6). Míra sorpce je m.j. závislá v této fázi na koncentraci, pH vzorku, které bývá

před nanesením roztoku upravováno dle povahy pevné fáze, a na objemu nanášeného roztoku analytů. Aplikace větších objemů může vést k odstranění kondicionačního činidla, a tím ke snížení extrakční účinnosti a výtěžnosti (1, 2).

3.) Promytí pevné fáze

Pro vymytí nechtěných složek ze vzorku se používá rozpouštědlo, ve kterém je vzorek rozpuštěn, nebo roztok, který tyto nečistoty odstraní. Obecně tedy rozpouštědlo se stejnou nebo mírně vyšší eluční silou než rozpouštědlo vzorku. Množství promývacího činidla se obvykle shoduje s objemem zvolené extrakční kolonky. Roztok musí být natolik silný, aby dokázal vymýt nežádoucí látky, a slabý na přerušení vazeb mezi látkou určenou k detekci a pevnou fází.

Tato fáze je důležitá pro odstranění zbytků matrice vzorku, jež se ve fázi nanesení vzorku uchytili spolu s ním na pevné fázi. Je žádoucí v této fázi sorbent nechat „vysušit“ spuštěným vakuem po dobu ~5 – 15 min. Tím se odstraní zbytky vodné fáze, kterou se promývalo. Usnadní to následně pozdější práci se vzorkem, to jest sušení analytu proudem dusíku (odpařování) (1, 2, 18).

4.) Eluce analyzovaných látek

V této fázi jímáme do zkumavek eluát, tedy výsledek extrakčního postupu, jež je posléze analyzován vybranou metodou, nejčastěji HPLC. Jedná se o desorpci analyzovaných látek (zpět z pevné fáze do kapalné) elučním činidlem zvoleným dle pravidla similia similibus solvuntur (Tab. 4), přičemž je rozhodující jeho síla a použitý objem (200 μ l – 2 ml dle velikosti kolonky). Malé objemy rozpouštědla určeného pro tuto fázi jsou nutné proto, aby byly eluovány vybrané navázané látky, ale zároveň ponechány nečistoty, které se nepodařilo odstranit v předchozí promývací fázi.

Efektivnější je rozpouštědlo pro eluci nanášet po menších dávkách, než celý jeho objem aplikovat jednorázově. Výtěžnost je v tomto bodě opět závislá na rychlosti průtoku elučního činidla. Je žádoucí, aby toto činidlo bylo určitý čas (20 s – 1 min) v kontaktu s analytem vázaným na pevné fázi. Vyhovující je taková rychlost, která zajistí vytékání eluátu formou kapek (1, 2, 10, 19, 20).

Tab. 4. Přehled rozpouštědel pro SPE (10)

Polarita	Rozpouštědlo	Mísitelnost s vodou
nepolární ↓	hexan	ne
	cyklohexan	ne
	chloroform	ne
	tetrahydrofuran	ano
	diethylether	ne
	aceton	ano
	acetonitril	ano
	isopropanol	ano
	methanol	ano
	voda	ano
polární	kyselina octová	ano

V pátém kroku by mohla v některých případech přijít na řadu i tzv. reaktivace pevné fáze. V určitých situacích lze sorbent v kolonce ošetřit tak, aby bylo možné jej použít znovu. Pro zachování reprodukovatelnosti postupu je ale obecně doporučováno jednorázové použití kolonek.

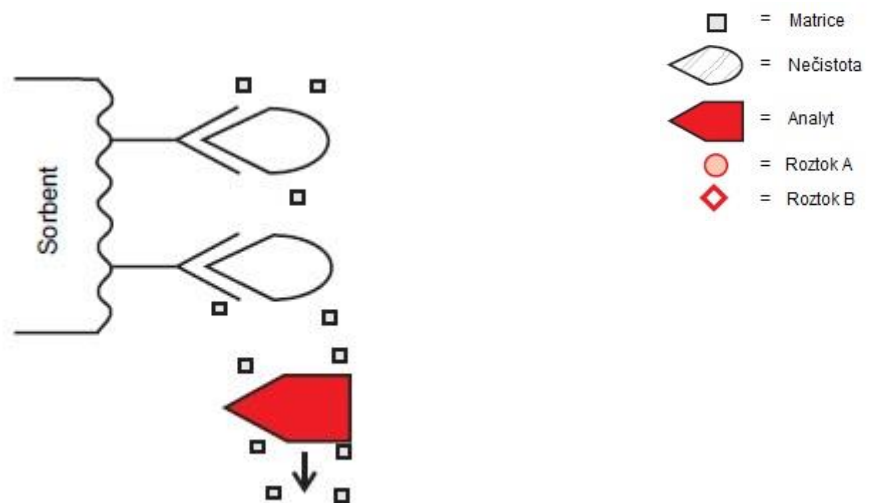
Dodržením všech výše uvedených pravidel a podmínek lze dosáhnout vysoké výtěžnosti, jež bývá pro SPE metodu 95 – 98 %. Výtěžnost celého procesu je určena měřením množství analytu po jeho eluci z pevné fáze a porovnáním s jeho původní koncentrací. Je závislá na mechanismech a podmínkách jak retence, tak i eluce. Při nedostatečném výsledku je nutné upravit jednu nebo více z výše jmenovaných proměnných, jinými slovy je zapotřebí provést optimalizaci příslušných podmínek (1).

Existují tři způsoby, jak při využití SPE metody oddělit nežádoucí látky ze vzorku určenému k následné analýze:

Selektivní extrakce (Obr. 5)

Sorbent je vybrán dle vlastností látky, která se na něj má navázat, tj. látka určená k analýze či nečistota. Při fázi nanesení vzorku se látka naváže a zbytek kolonkou prochází. V případě, že dochází k navázání látky určené k analýze, je následně

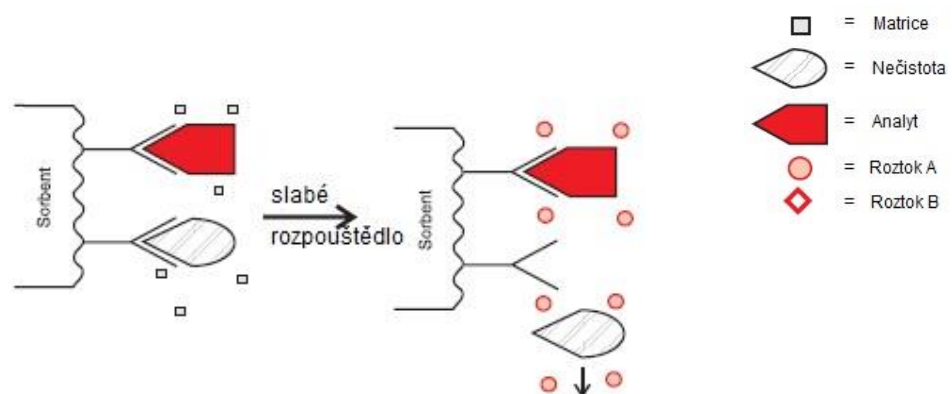
provedena eluce této látky. V druhém případě (navázání nečistoty na pevnou fázi) postupuje k analýze vzorek prošlý kolonkou po nanesení, který již tyto zachycené nečistoty neobsahuje. Zde je zapotřebí promýt kolonku činidlem, jenž bylo použito k rozpuštění analytu, v množství odpovídajícím objemu použité kolonky. Tím je zajištěno, že na sorbentu nezůstaly zachyceny látky určené k analýze. Promytí zde nahrazuje fázi eluce a celý proces extrakce je tak v tomto případě zkrácen o jeden krok. Znamená to, že zde odpadá fáze eluce dané látky z kolonky (6, 20).



Obr. 5. Schéma selektivní extrakce (6)

Selektivní promývání (Obr. 6)

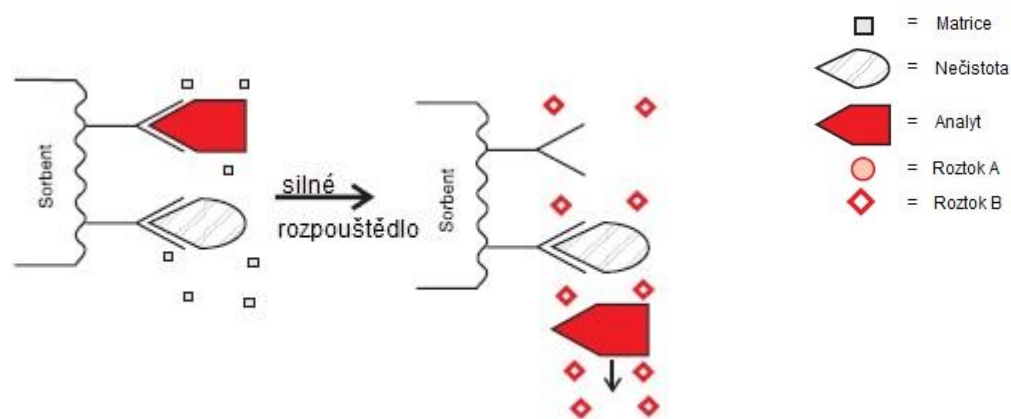
Všechny komponenty jsou při nanesení vzorku zachyceny na sorbentu. K selektivnímu promytí se užije takový roztok, který má dostatečnou sílu na to, aby vymyl z pevné fáze vázané nečistoty. Zároveň je slabý na rozrušení vazebných sil mezi sorbentem a analytem (6, 20).



Obr. 6. Schéma selektivního promývání (6)

Selektivní eluce (Obr. 7)

Analyt i nečistoty jsou opět při aplikaci vzorku zachyceny pevnou fází. V dalším kroku se použije takový roztok, který přeruší vazby mezi sorbentem a analytem, zatímco pevně vázané nečistoty zůstávají zachyceny (6, 20).



Obr. 7. Schéma selektivní eluce (6)

2.4 Sorbenty na bázi SiO₂ a oxidů kovů

Silikagelové pevné fáze patří v dnešní době k těm nejpoužívanějším. Existují v různých úpravách pro normální a reverzní uspořádání fází a také jako iontoměniče. Neustále jsou ale hledány nové a svými vlastnostmi výhodnější materiály pro výrobu sorbentů. V současnosti obrací výzkum v této oblasti svůj zájem na oxidy kovů.

2.4.1 Silikagelové pevné fáze - SiO₂

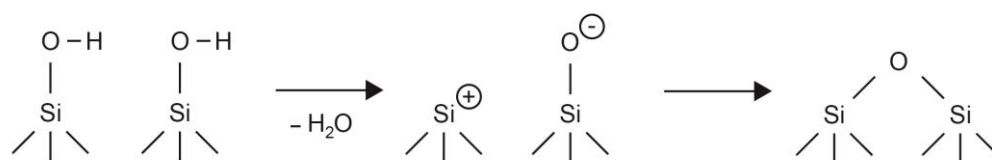
Fyzikální vlastnosti

Křemík je tetrahedrální – koordinační číslo 4. Silikagel má amorfni strukturu. Hustota silikagelu 2,2 g/cm³, jakožto nejnížší v porovnání s TiO₂ a ZrO₂, činí tento sorbent mechanicky nejméně stabilním.

Silikagel, jakožto nejpoužívanější materiál pro pevné fáze, si své postavení zasloužil díky svým výhodným vlastnostem. K těm patří velký povrch monodisperzních částic, jejich mechanická odolnost a v neposlední řadě také schopnost modifikace povrchu podle potřeby separace (21, 22).

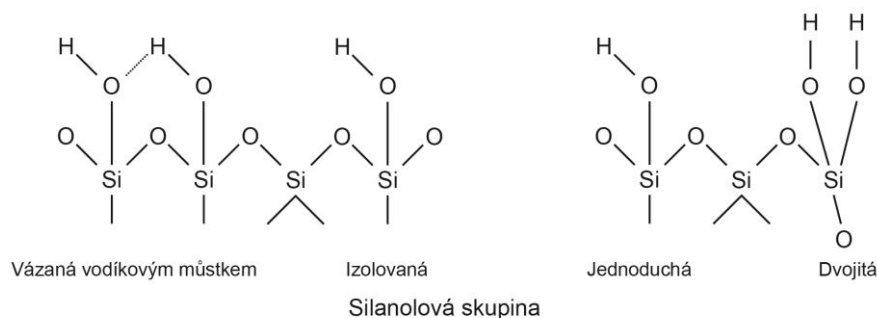
Chemické vlastnosti

Po stránce acidobazické vystupuje jako slabá kyselina dle Broensted-Lowryho teorie, vzhledem k přítomnosti silanolových skupin, jejichž pK_a je 7. Při vyšších teplotách však díky probíhající dehydrataci může vzniknout stav, kdy se na povrchu vyvine kyselost dle Lewise (Obr. 8).

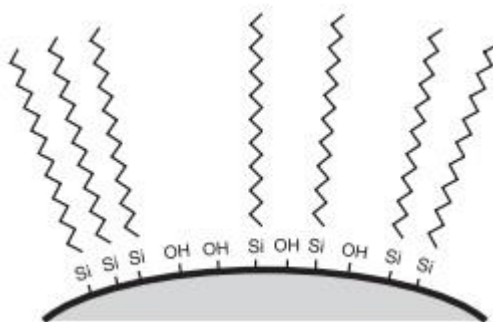


Obr. 8. Reakce silikagelu za vyšších teplot – vznik Lewisovy kyseliny (23)

Povrch neupraveného silikagelu je polární díky přítomným silanolovým skupinám (Obr. 9). Spíše se ale využívá nejrůznějších modifikací tohoto povrchu tak, že se na $-OH$ skupiny chemickou reakcí naváží různé radikály. Často se jedná o řetězce C_8 nebo C_{18} . Tím vznikají fáze nepolární, taktéž zvané reverzní. Nedochází však k obsazení veškerých hydroxylových skupin, jejichž malé množství je stále přítomno. (Obr. 10) (1, 16, 22, 24).



Obr. 9. Struktura polárního silikagelu – silanolová skupina (23)

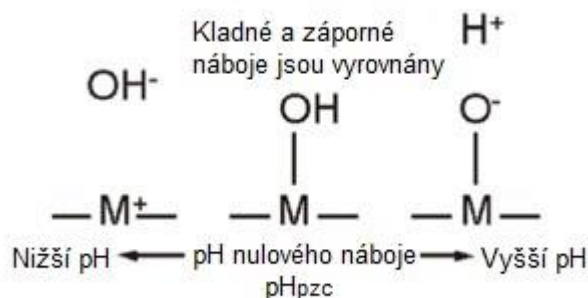


Obr. 10. Reverzní C18 silikagelová fáze s volnými silanolovými skupinami (16)

Asi největší nevýhodou silikagelových materiálů je jejich stabilita jen v určitém rozmezí pH. Aby byly při analýze stabilní, uvádí se, že by se pH mobilní fáze mělo pohybovat mezi hodnotami 3 až 9.

Pokud bychom tedy použili mobilní fázi pod pH 3, silikagel na to reaguje kyselou hydrolyzou siloxanové vazby. Při pH nad 9 dochází k rozpouštění silikagelu. Ačkoli se řešení této situace zdá teoreticky jednoduché – použití mobilních fází s pH v rozmezí 3 – 9, skutečnost je jiná. Volba pH mobilní fáze je totiž jednou z možností, jak optimalizovat podmínky pro lepší průběh separace. Jsou tedy snahy tuto nestabilitu mimo dané rozmezí pH nějakým způsobem odstranit tak, aby bylo možné silikagelové materiály používat ideálně nezávisle na aciditě či bazicitě prostředí.

Nevýhodou silikagelových fází je nízká hodnota pH_{pzc} (Obr. 11). Silanolové skupiny tak disociují při neutrálním pH za vzniku záporného náboje a jsou proto schopny vystupovat pouze jako katexy. Při chromatografii alifatických aminů dochází k jejich protonaci. Mezi negativně nabitými skupinami pevné fáze a pozitivně nabitými skupinami analytu vznikají silné nežádoucí elektrostatické interakce. V tomto případě je na místě výměna sorbentu za jiný. (21)



Obr. 11. pH nulového náboje (pH_{pzc}, point of zero charge) (25)

2.4.2 Pevné fáze na bázi oxidů kovů – TiO₂

Fyzikální vlastnosti

Existují tři krystalografické soustavy oxidu titaničitého. Jsou jimi anatas, rutil a brookit. Modifikace známá jako brookit je nestabilní. Anatas je termálně stabilní do 800 °C a nad touto teplotou pak přechází v rutil. Sorbent z TiO₂ je krystalická struktura anatasu, kde má titan koordinační číslo 6.

TiO₂ je mechanicky stabilnější než SiO₂ díky větší hustotě, která u této pevné fáze nabývá hodnot 4,0 g/cm³. Plocha povrchu částic TiO₂ a objem jejich pórů se snižuje se zvyšující se teplotou. V současnosti jsou sorbenty z oxidu titaničitého pro extrakce s normálním uspořádáním fází dodávány pod obchodním názvem Sachtopore[®] (Tab. 5) (21, 22).

Tab. 5. Parametry TiO₂ Sachtopore[®] (21)

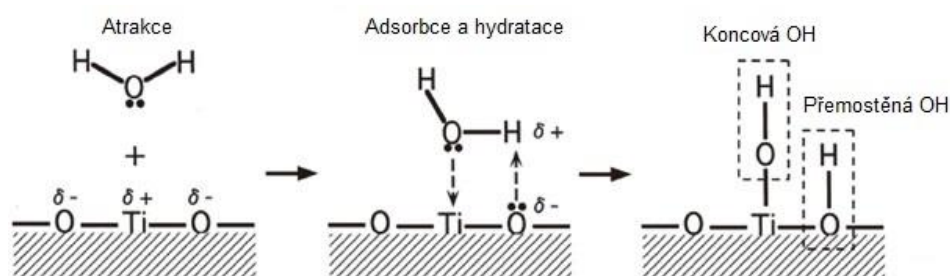
Průměr pórů [Å]	Specifický povrch [m ² /g]	Specifický objem pórů [ml/g]	Průměr částic [μm]
60	100	0,2	3,5,10,20,40,80
100	55	0,21	3,5,10,20,40,80
300	15	0,12	3,5,10,20,40,80
2000	<5	nedefinováno	3,5,10,20,40,80

Částice o průměru pórů 60, 100 a 300 Å jsou vyráběné z anatasu, 2000 Å z rutilu.

Chemické vlastnosti

Povrch oxidu titaničitého se chová jako silná Lewisova kyselina. Modifikace známá jako anatas zároveň vykazuje dle Broensted-Lowryho teorie největší kyselé vlastnosti ze všech oxidů kovů s pK_a 0,5 – 2.

Je chemicky stabilní v celém rozsahu stupnice pH, tedy od 1 do 14. Proces vzniku hydroxylových skupin probíhá za přítomnosti molekul vody (Obr. 12). Aktivní –OH skupiny na povrchu TiO_2 disociují ve vodném prostředí dle jeho pH s ohledem na hodnotu pH_{pzc} TiO_2 , jež se rovná 5 (22, 25).



Obr. 12. Reakce povrchu TiO_2 s molekulami H_2O (25)

2.4.3 Pevné fáze na bázi oxidů kovů – ZrO_2 ; ZrO_2 -SAX

Fyzikální vlastnosti

Oxid zirkoničitý existuje ve třech krystalových modifikacích – jednoklonná (za laboratorní teploty), čtverečná (při teplotách vyšších jak $1175\text{ }^\circ\text{C}$) a stabilní krychlová (při teplotách nad $2350\text{ }^\circ\text{C}$). Každá soustava vzniká fázovou přeměnou z předchozí soustavy vlivem vyšších teplot. Struktura ZrO_2 je tedy krystalická, Zr^{4+} zde má koordinační číslo 7.

Jednoklonná krystalová struktura ZrO_2 vykazuje hustotu $5,8\text{ g/cm}^3$. Čím vyšší hustota, tím vyšší mechanická stabilita. Ta je u ZrO_2 nejvyšší ze všech uváděných sorbentů (22).

Plocha povrchu ZrO_2 se se zvyšující teplotou snižuje. Při teplotách nad $500\text{ }^\circ\text{C}$ je tato plocha pod hodnotou $100\text{ m}^2/\text{g}$. Další teplotně závislou vlastností je průměr pórů, jenž vzrůstá se zvyšující se teplotou. Pokud na materiál působí teploty nižší než $500\text{ }^\circ\text{C}$, obsahuje frakci mikropórů $<20\text{ \AA}$. Takto mikroporózní materiál není pro analýzu příliš

vhodný. Velké molekuly se totiž nedostanou k povrchu těchto mikropórů a zároveň brání přenosu látek menších rozměrů. Vyšší teplotou dojde ke zvýšení průměru velikostí pórů, což jinými slovy znamená, že dojde k eliminaci nežádoucích mikropórů.

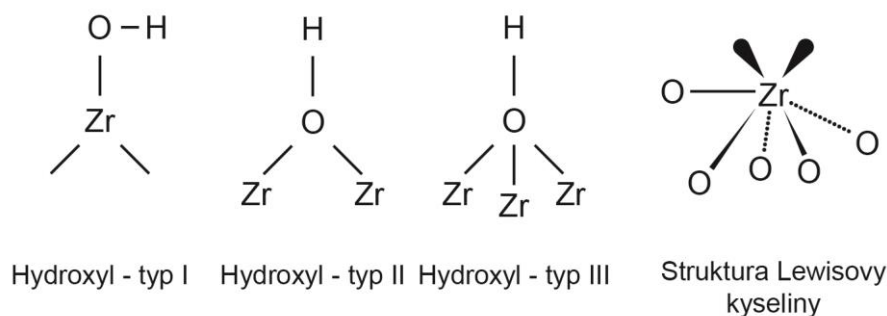
Taktéž tvar pórů je závislý na tepelném působení. Při nízkých teplotách jsou částice ZrO_2 sférické či kónické. Při vyšších teplotách získávají částice podobu více cylindrickou. Díky tomuto tvaru dochází i k lepšímu průtoku mobilní fáze při extrakci či analýze. Teplotou je ovlivněna i mechanická odolnost ZrO_2 . Se zvyšující se teplotou se stávají částice odolnějšími. Dochází k jejich spečení, během kterého se blíží ke svému bodu tání (26).

Chemické vlastnosti

Především díky výhodnějším chemickým vlastnostem je dnes ZrO_2 zkoumán jako potenciálně vhodnější materiál pro výrobu sorbentů. Těmito vlastnostmi jsou chemická stabilita, výborná schopnost adsorpce, díky které lze mimo jiné i upravit povrch tak, jak je zapotřebí. Chemicky stabilní je ZrO_2 v celém rozmezí pH. Pouze některá velmi agresivní rozpouštědla poškozují integritu ZrO_2 . Jsou jimi například koncentrovaná kyselina sírová, kyselina fluorovodíková, kyselina fosforečná nebo kyselina dusičná (26).

Povrch vykazuje výraznou kyselost i bazicitu dle Lewisovy teorie kyselin a zásad, pK_a se pohybuje v rozmezí hodnot 10–13. Příčinou této kyselosti jsou vakantní orbitály, následkem čehož vzniká i pozitivně nabitě Zr^{4+} . Nositele bazicity dle Lewisovy teorie (donor elektronů, záporný náboj) zde představuje sousedící kyslík. Zirkonium obsahuje také slabě kyselé -OH skupiny, jejichž acidita je však slabší v porovnání s -OH skupinami silikagelu. Povrch oxidu zirkoničitého také reaguje s molekulami vody a dle pH prostředí dochází k příslušné disociaci, $pH_{pzc} = 8$. Zr^{4+} je multivalentní, tudíž je možné, aby se na samotný ion navázal více než jeden ligand. Části povrchu ZrO_2 ukazuje Obr. 13 (22, 26, 27).

Lewisovy kyseliny přítomné na povrchu ZrO_2 vážou Lewisovy báze (H_2O , OH^- , fosfáty, sulfáty, boráty, uhličitany, fluoridy), závisí na pH roztoku či složení pufru. Adsorbované bazické jednotky mohou ovlivnit kapacitu iontové výměny tím, že přemění povrchové Lewisovy kyseliny v aniontové skupiny. Každá složka roztoku tedy může být příčinou změny selektivity povrchu stacionární fáze (26).



Obr. 13. Povrch ZrO_2 (26)

Komerčně vyráběné stacionární fáze ZrO_2 a jejich modifikace jsou dnes dodávány firmou ZirChrom Separations, Inc. Přehled těchto fází uvádí tabulka 6 (21).

Tab. 6. Komerčně dostupné zirkoniové fáze (21)

Název	Separáčnı́ mód	Název	Separáčnı́ mód
DiamonBond C18	reverznı́	ZirChrom [®] SAX	silnı́ anex
ZirChrom [®] Carb	reverznı́	ZirChrom [®] SHAX	silnı́ anex
ZirChrom [®] Phase	normálnı́	ZirChrom [®] PEZ	katex
ZirChrom [®] -PBD	reverznı́	ZirChrom [®] PS	reverznı́
ZirChrom [®] WCX	slabı́ katex	ZirChrom [®] EZ	reverznı́
ZirChrom [®] WAX	slabı́ anex		

WCX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný 1,4-butandioldiglycidyletherem ; WAX: s navázaným polyethyleniminem; SAX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný 1,4-butandioldiglycidyletherem a kvaternizovaný methyljodidem; SHAX: s navázaným polyethyleniminem, síťovaný diiododekanem a kvaternizovaný methyljodidem.

PBD: polybutadien; PEZ: P-EDTA; PS: polystyren; ES: PEZ modifikovaný pomocí P-EDTA.

Jak již bylo zmíněno, výzkum za účelem hledání nových sorbentů probíhá neustále. V případě ZrO_2 existují jeho varianty na bázi smíšených oxidů, které jsou dále modifikovány Lewisovými bázemi s dlouhými alkylovými řetězci. Jedná se například o reverznı́ fáze PA-MgO- ZrO_2 , PA-CeO₂- ZrO_2 nebo SA-CeO₂- ZrO_2 (28).

ZrO₂-SAX

Sorbent je vhodný pro separaci anorganických nebo organických aniontů. Hodí se především pro separaci ve vodě rozpustných vitamínů. Chemicky stabilní je při pH 1 - 12 (29).

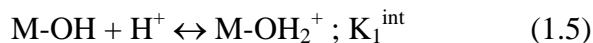
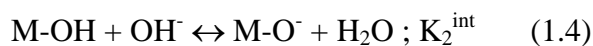
2.4.4 Mechanismy interakce oxidů kovů

Interakce probíhající při separaci mezi analytem a pevnou fází na bázi oxidů kovů se značně odlišují od SiO₂ sorbentů. Povrchy TiO₂ a ZrO₂ díky svým vlastnostem popsaným výše umožňují retenci látek na základě dvou mechanismů, (1) iontové a (2) ligandové výměny. Za tyto komplexotvorné vlastnosti TiO₂ a ZrO₂, které umožňují tyto dva mechanismy retence, mohou vysoká koordinační čísla kovů (22).

Používány jsou většinou modifikované oxidy kovů, u kterých se předpokládá smíšený mechanismus retence. Pokud je například požadován reverzní mód pro separaci, umístí se určitý řetězec o nízké polaritě do povrchových pórů vybrané pevné fáze. Způsob retence poté závisí na dalších podmínkách separace, jež určí, který z oněch dvou mechanismů nakonec převáží. Vliv má pH, iontová síla roztoku, typ užitého pufu.

1.) Iontová výměna

Iontová výměna je na povrchu oxidů kovů založena na schopnosti disociace hydroxylových skupin (1.4) nebo jejich protonace (1.5), kde K_1^{int} a K_2^{int} jsou vnitřní ionizační konstanty:



Při pH_{pzc} jsou negativně ($M-O^-$) a pozitivně ($M-OH_2^+$) nabitě částice vyrovnané. Vzhledem k vyšším hodnotám pH_{pzc} mají oxidy kovů amfoterní vlastnosti. Závisí na pH, zda se budou chovat jako katexy či anexy. Obecně platí, že při pH nad hodnotou pH_{pzc} budou vystupovat jako měniče kationtů, při pH nižším než je pH_{pzc} jako měniče

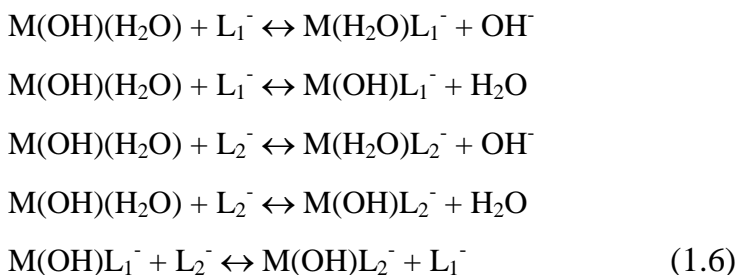
aniontů. Při neutrálním pH nenesou negativní náboj a nedochází tak ke vzniku výrazných elektrostatických vazeb s nabitými bázemi jako tomu je u silikagelu (21).

2.) Ligandová výměna

Schopnost oxidů kovů ligandové výměny vyplývá z přítomnosti Lewisových kyselin – Ti^{4+} a Zr^{4+} a molekul H_2O vázaných na povrchu.

Teorie separační schopnosti založená na ligandové výměně byla studována na pevných fázích ZrO_2 bez navázaných substituentů. Neexistuje však úprava povrchu, která by jakýmkoli zásahem kompletně zablokovala Lewisovy interakce. Mechanismus ligandové výměny se proto předpokládá i u modifikovaných oxidů kovů.

Reakce ligandové výměny popisují následující rovnice (1.6), kde M – kov, L_1 a L_2 – Lewisovou bázi je analyt, či rozpouštědlo:



Přítomné molekuly vody jsou klíčové, bez nich by ligandová výměna neprobíhala. Mohou být vyměněny za jinou Lewisovu zásadu. Čím silnější je tato zásada, tím snadněji probíhá výměna (21).

Možné využití nesilikagelových materiálů v praxi

Na povrchu nesilikagelových materiálů dochází k silné interakci m. j. i s fosfátovými ionty mechanismem ligandové výměny. Fosfátové skupiny jsou součástí různých biomolekul, např. fosfolipidů, fosfoproteinů, nukleotidů. Tohoto jevu se dnes využívá v oblasti selektivního získávání uvedených molekul z biologických materiálů.

Taktéž dochází k silné interakci s karboxylovými funkčními skupinami, jež jsou opět součástí např. proteinů. Zde hodně záleží na zvoleném typu mobilní fáze, zda při určitém složení k eluci proteinů dojde či nikoli. Retence je způsobena

jak ligandovou, tak iontovou výměnou. Eluce tak může být ovlivněna změnou koncentrace Lewisovy báze nebo změnou iontové síly (21, 30, 31).

3. Cíle

Tato diplomová práce je zaměřena na výzkum sorbentů na bázi oxidů kovů. Vlastnosti těchto pevných fází jsme zkoušeli v různých prostředích a uspořádáních. Změnou pH či složení rozpouštědel jsme hledali optimální podmínky, jež by zajistily vysokou výtěžnost. Metodu jsme prováděli v módu s retencí polárních analytů ve vodném prostředí a HILIC podmínkách.

Zkoumány byly vzorky kyselých a zásaditých modelových látek na TiO_2 , ZrO_2 a ZrO_2 -SAX. Hlavním úkolem bylo prověřit extrakční schopnosti těchto materiálů a zjistit, zda jsou vhodné pro využití v SPE.

4. Experimentální část

4.1 Přístrojová technika

- **Vybavení pro SPE**

SPE Manifold Supelco Visiprep - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

Polypropylenové SPE kolonky 1 ml - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

PE frity pro 1ml SPE kolonky - Sigma-Aldrich (St. Luis, USA)

ZirChrom-PHASE 25 $\mu\text{m}/300\text{\AA}$ - ZirChrom (Anoka, USA)

Sachtopore NP 20 $\mu\text{m}/300\text{\AA}$ - Sachtleben Chemie (Duisburg, Německo)

Silikagel 40 $\mu\text{m}/60\text{\AA}$ - Merck Millipore (Darmstadt, Německo)

- **Vybavení pro analýzu**

HPLC systém Prominence s PDA detektorem SPD-M20A - Shimadzu (Kyoto, Japonsko):

- pumpy LC-20AD
- autosampler SIL-20AC
- řídicí jednotka CBM-20A
- kolonový prostor CTO-20AC
- kolona Symetry C18, 100 \AA , 5 μm , 3,9x150 mm – Waters Corporation (Massachusetts, USA)

Spektrofotometr UV-2401PC - Shimadzu (Kyoto, Japonsko)

- **Ostatní laboratorní zařízení**

Acidimetr 333 pH-metr - Druopta Praha (Praha, ČR)

Kraintek K-10 ultrazvuková vana - Kraintek s.r.o. (Podhájska, Slovenská republika)

Kern ABT 220-4M analytické váhy - KERN & SOHN GmbH (Balingen, Německo)

Laboratorní sklo, pomůcky a zařízení pro sušení dusíkem

4.2 Chemikálie

Lachema Brno-Neratovice, ČR:

Fosforečnan amonný

Kyselina p-aminobenzoová

Mravenčan amonný

Octan amonný

Tetraboritan sodný

Penta-Praha, ČR

25% amoniak

Aceton

Kyselina trifluoroctová

Sigma Aldrich-St. Louis, USA

Diklofenak

Hydroxid sodný

Ibuprofen

Kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová

Kyselina 2,4-dihydroxybenzoová

Kyselina chlorovodíková

Kyselina p-hydroxybenzoová

Tris(hydroxymethyl)aminomethan

Merck Millipore-Merck-Darmstadt, Německo

Acetonitril

Čištěná voda (pokud je v diplomové práci zmíněno užití vody, je tím myšlena čištěná voda)

Dr. Kulich Pharma-Hradec Králové, ČR

Kyselina fosforečná

Kyselina salicylová

4.3 Příprava zásobních roztoků

5mM mravenčanový pufr:

176 μ l 5% NH_3 byl v odměrné baňce naředěn vodou, poté bylo pH nastaveno pomocí HCOOH na 2,7. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM octanový pufr:

0,019 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě, poté bylo pH upraveno pomocí CH_3COOH na 4,7. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM fosforečnanový pufr:

0,037 g $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě, poté bylo pH upraveno pomocí H_3PO_4 na 4,7. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM pufr MES:

0,049 g MES bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě, poté bylo pH upraveno pomocí NaOH na 6,3. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

5mM pufr TRIS:

0,030 g TRIS bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě, poté bylo pH upraveno pomocí HCl na 8,3. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

0,1% (8,8 mM) trifluorooctový pufr:

0,050 ml CF_3COOH bylo v odměrné baňce doplněno vodou na 50 ml, $\text{pH} = 2,0$.

5mM tetraboritanový pufr:

0,05 g tetraboritanu sodného bylo v odměrné baňce rozpuštěno ve vodě, poté bylo pH upraveno pomocí HCl na 4,7. Odměrná baňka byla doplněna vodou na 50 ml.

Ředění ACN:

ACN byl dle konkrétního pokusu zředěn na příslušnou koncentraci vodou, či příslušným pufrům. Pokud není uvedeno, ředění bylo provedeno vodou.

Ředění NH₃:

NH₃ byl dle konkrétního pokusu ředěn na příslušnou koncentraci vodou, či acetonem. Pokud není uvedeno, ředění bylo provedeno vodou.

Zásobní roztok modelových látek:

Konkrétní látka byla rozpuštěna v metanolu na koncentraci 5 mg/ml. Jednotlivé látky byly poté ve stejném poměru smíchány do směsi po šesti PAB, PHB, OHB, SAL, DIC, IBU, po třech PAB, PHB, OHB, či po třech SAL, DIC, IBU nebo použity jednotlivě.

Vzorek pro nanesení bez plazmy:

Zásobní roztok modelových látek byl naředěn příslušným pufrem, x% ACN, či vodou dle prováděného pokusu v poměru 1 : 9, v/v. Koncentrace analytů ve vzorku: dohromady PAB, PHB, OHB, SAL, DIC, IBU = 83,3 µg/ml; zvlášť PAB, PHB, OHB či SAL, DIC, IBU = 166,7 µg/ml; jednotlivé analyty = 500 µg/ml.

Vzorek pro nanesení s plazmou:

Zásobní roztok modelových látek byl smíchán s plazmou a dle příslušného pokusu vodou, příslušným pufrem, či x% ACN v poměru 1 : 1 : 8, či 1 : 5 : 4, v/v/v. Koncentrace analytů ve vzorku: dohromady PAB, PHB, OHB, SAL, DIC, IBU = 83,3 µg/ml; zvlášť PAB, PHB, OHB či SAL, DIC, IBU = 166,7 µg/ml; jednotlivé analyty = 500 µg/ml.

Vzorek plazmy:

Plazma byla naředěna dle provedení příslušným pufrem v poměru 1 : 1, v/v.

Mobilní fáze A:

0,01M H₃PO₄ upravená NH₃ na pH 3,0 + ACN v poměru 9 : 1, v/v.

Mobilní fáze B:

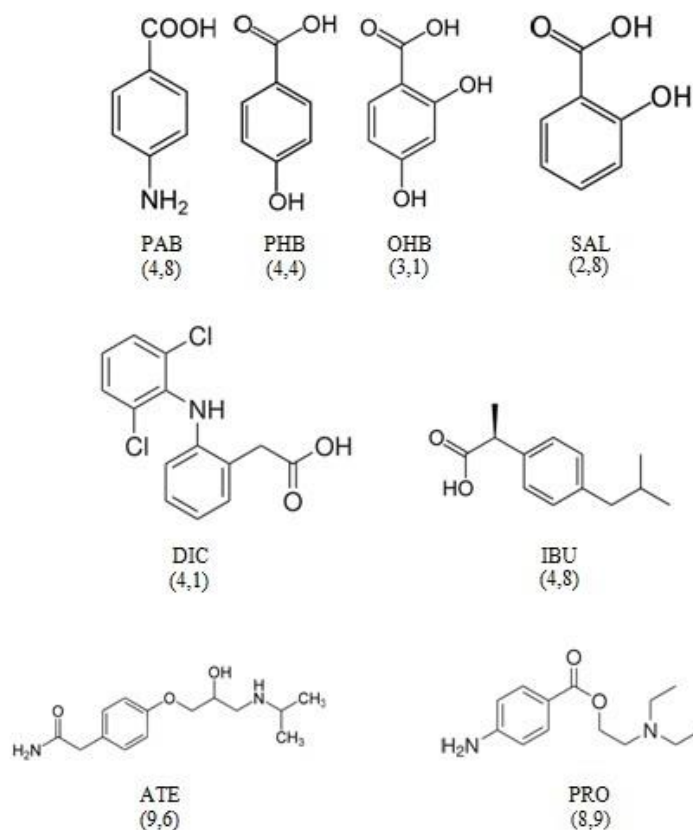
100% ACN

5. Výsledky a diskuze

Extrakční schopnost vybraných sorbentů, jsme zkoušeli nejprve na kyselých, později i na zásaditých analytech. Modelovými látkami byly kyselina p-aminobenzoová (PAB), p-hydroxybenzoová (PHB), 2,4-dihydroxybenzoová (OHB), salicylová (SAL), diklofenak (DIC), ibuprofen (IBU) a báze atenolol (ATE), prokain (PRO) (Obr. 14). Zprvu jsme retenci látek testovali ve vzorcích bez plazmy. Poté jsme zkoumali extrakční výtěžnost s roztoky analytů v přítomnosti plazmy. K dispozici jsme měli králičí plazmu s obsahem heparinu.

Pokusy probíhaly vždy ve dvou provedeních, v HILIC podmínkách a v módu s retencí polárních látek ve vodném prostředí. Rostoucí požadavky na separaci silně polárních látek vedly k vývoji HILIC chromatografie. V dnešní době se jedná o perspektivní metodu, jež využívá polární stacionární fáze a vodně-organické prostředí mobilní fáze (32, 33).

Extrakční kolonky jsme si připravovali sami v čase potřeby naplněním příslušného sorbentu v množství 100 mg. Pro tvorbu podtlaku jsme použili vodní vývěvu.



Obr. 14. Struktury modelových látek a jejich hodnoty pK_a (34, 35)

5.1 Stacionární fáze na bázi TiO₂, ZrO₂ – vzorek bez plazmy

5.1.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí

Kondicionace byla provedena 1 ml příslušného pufru či 1 ml vody. Poté se nanoslo 150 µl vzorku, promylo 1 ml pufru či 1 ml vody a elovalo 1,5 ml amoniaku či 1,5 ml acetonitrilu.

Současně byl připraven vzorek pro porovnání při analýze pomocí HPLC sestávající ze složek, které by se měly nacházet v eluátu, tzn. analyzované látky a činidlo použité pro eluci.

TiO₂

Nejprve jsme zkoušeli afinitu modelových látek v prostředí o různém pH. Ke kondicionaci jsme použili postupně pufrы o pH 2,0 (0,1% TFA); 2,7 (5mM HCOONH₄); 4,7 (5mM CH₃COONH₄). Promývali jsme vodou a elovali 5% NH₃.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Eluát byl upraven v odměrné baňce přidáním 300 µl 50% H₃PO₄, 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. (Tab. 7)

Tab. 7. Retence látek na TiO₂ při různém pH a při promytí vodou

analyt	pH = 2,0		pH = 2,7		pH = 4,7	
	eluce		eluce		promytí	eluce
PAB	3 %	21 %	3 %	38 %	92 %	2 %
PHB	3 %	19 %	3 %	37 %	81 %	4 %
OHB	48 %	66 %	38 %	70 %	64 %	34 %
SAL	38 %	66 %	31 %	60 %	74 %	21 %
DIC	23 %	32 %	25 %	50 %	81 %	13 %
IBU	8 %	24 %	7 %	31 %	77 %	0 %

Kondicionace: pufrы o pH 2,0; 2,7; 4,7; **Promytí:** voda; **Eluce:** 5% NH₃

Při pH 1,4 a 2,7 byly výsledky nejednotné. Příliš nízké pH (pod pK_a jednotlivých látek) navodilo nevhodné prostředí pro vytvoření žádoucích vazeb.

Při pH 4,7 bylo dosaženo lepších výsledků, co se týče jejich jednotnosti. V tomto případě jsme podrobili analýze také fázi po promytí, abychom mohli určit důvod nízké eluční výtěžnosti. Analyzované látky byly detekovány právě v promývací fázi, což není

žadoucí. Příčinou je zde použití vody jako promývacího činidla. Voda se chová jako Lewisova báze, v tomto případě tedy jako silnější báze než analyzované látky, tudíž došlo k přerušení vazeb vzniklých při jejich nanesení mezi látkami a sorbentem (36).

Z předchozích výsledků plyne, že voda k promývání není vhodná. Zkusili jsme tedy k promytí kolonek použít stejný roztok jako pro kondicionaci a tedy i stejné prostředí, ve kterém je vzorek přítomen, což odpovídá obecnému postupu v SPE. Sorbent jsme tedy aktivovali a promyli postupně pufrů o pH 2,0 (0,1% TFA); 2,7 (5mM HCOONH₄); 4,7 (5mM CH₃COONH₄). Eluci jsme tentokrát provedli 5% NH₃, jenž vznikl naředěním 25% NH₃ acetonem v poměru 4 : 1, v/v.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 8)

Tab. 8. Retence látek na TiO₂ při různém pH a při promytí příslušným pufrům

analyt	pH = 2,0		pH = 2,7		pH = 4,7	
	promytí	eluce	promytí	eluce	promytí	eluce
PAB	100 %	5 %	64 %	41 %	99 %	4 %
PHB	92 %	7 %	57 %	45 %	91 %	5 %
OHB	57 %	35 %	42 %	61 %	58 %	29 %
SAL	61 %	27 %	53 %	51 %	83 %	18 %
DIC	28 %	56 %	24 %	58 %	29 %	67 %
IBU	62 %	19 %	39 %	46 %	74 %	26 %

Kondicionace: pufr o pH 2,0; 2,7; 4,7; **Promytí:** pufr o pH 2,0; 2,7; 4,7; **Eluce:** 5% NH₃

Promytí různými pufrů přineslo podobné výsledky jako při promytí vodou. Při pH 2,0 a 2,7 však výsledky byly alespoň jednotné. Přítomné molekuly vody však opět stačily k přerušení vazeb u většiny látek. Ačkoli u diklofenaku lze pozorovat mírné zvýšení procentuálního výtěžku se zvyšujícím se pH.

ZrO₂

Za podobných podmínek jako TiO₂ jsme zkoumali ZrO₂. Pro kondicionaci jsme použili postupně pufrů o pH 4,7 (5mM CH₃COONH₄) a 6,3 (5mM MES). Dále jsme postupovali stejně: kolonky promyli vodou, eluci provedli 5% NH₃. (Tab. 9)

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Eluát byl upraven v odměrné baňce přidáním 300 µl H₃PO₄, 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml.

Tab. 9. Retence látek na ZrO₂ při různém pH a promytí vodou

analyt	pH = 4,7		pH = 6,1	
	promytí	eluce	promytí	eluce
PAB	0 %	94 %	4 %	91 %
PHB	0 %	98 %	-	-
OHB	0 %	83 %	0 %	72 %
SAL	0 %	96 %	4 %	86 %
DIC	0 %	93 %	1 %	98 %
IBU	17 %	82 %	11 %	83 %

Kondicionace: pufr o pH 4,7; 6,3; **Promytí:** voda; **Eluce:** 5% NH₃

Nejsou příliš velké rozdíly mezi výsledky při pH 4,7 a 6,3. Nicméně v tomto případě (na ZrO₂) se užití vody jako promývacího činidla oproti TiO₂ osvědčilo. Až amoniak, jakožto nejsilnější Lewisova báze vůbec, vazby mezi kyselinami a sorbentem přerušila a výsledkem tak byla poměrně vysoká výtěžnost.

Tento pokus jsme obměnili pro kyselinu PAB tak, že jsme zkusili sorbent aktivovat vodou místo příslušným pufrům. Výtěžek byl v promytí 0 %, v eluci pak 87 %, což je výsledek srovnatelný, i když o něco málo nižší než v předchozích pokusech.

Nakonec jsme se rozhodli změnit typ elučního činidla. Povrch ZrO₂ jsme aktivovali opět 5mM octanovým pufrům (pH = 4,7), k promytí použili vodu a eluci jsme se pokusili provést pomocí 50% ACN.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Eluát byl v odměrné baňce doplněn vodou na 5 ml. (Tab. 10)

Tab. 10. Retence látek na ZrO₂ při eluci 50% ACN

analyt	promytí	eluce
PAB	0 %	10 %
PHB	0 %	8 %
OHB	0 %	0 %
SAL	0 %	0 %
DIC	0 %	52 %
IBU	0 %	77 %

Kondicionace: pufr o pH 4,7; **Promytí:** voda; **Eluce:** 50% ACN

Eluce 50% acetonitrilem při zachování předešlých podmínek se neosvědčila. Ačkoli by se dalo předpokládat, že dle provedených studií zabývajících se závislostí retence derivátů kyseliny benzoové na koncentraci ACN dojde k eluci většiny látek, především PAB a PHB. Retence těchto dvou kyselin byla v těchto studiích nejmenší při této koncentraci ACN (37, 38). Během tohoto pokusu ve vodném prostředí pravděpodobně nedošlo k vytvoření takových podmínek pro eluci 50% ACN, jako když by byl pokus proveden v HILIC podmínkách. DIC a IBU však byly z větší části eluovány.

Promytí vodou v předchozích pokusech ZrO₂ na rozdíl od TiO₂ bylo úspěšné. Předpokládali jsme tedy, že při použití stejného vodného roztoku pufru ke kondicionaci a zároveň promytí, dosáhneme stejně dobrých výsledků. Rozhodli jsme se tedy otestovat vliv různých pufrů, 5mM MES, 5mM (NH₄)₃PO₄, 5mM Na₂B₄O₇, nastavených na stejné pH. Hodnotu pH 4,7 jsme zvolili na základě předchozích výsledků, při kterých byla retence analytů neoptimálnější. Eluci jsme provedli 5% NH₃, jenž vznikl naředěním 25% NH₃ acetonem v poměru 4 : 1, v/v.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven přidáním 500 µl acetonitrilu a 500µl vody. (Tab. 11)

Tab. 11. Vliv různých pufrů o pH 4,7 na retenci PAB na ZrO₂

analyt	pufr	promytí	eluce
PAB	MES	0 %	98 %
	fosforečnan amonný	104 %	1 %
	tetraboritan sodný	24 %	78 %

Kondicionace: příslušný pufr o pH 4,7; **Promytí:** příslušný pufr o pH 4,7; **Eluce:** 5% NH₃

Jako nejvhodnější pufr pro navození pH 4,7 se jevil 5mM MES. Krom tohoto by se dalo uvažovat jako o vhodném pufru i o 5mM octanu amonném, který byl použit při kondicionaci v jednom z předešlých pokusů, kde k promytí byla užita voda, k eluci 5% NH₃ a výtěžnost pro PAB byla 94 %. Fosfátový anion patří mezi nejsilnější Lewisovy báze, proto jím došlo při promytí fosfátovým pufrům k vytěsnění PAB z povrchu ZrO₂ (21).

Z podobného důvodu došlo k menšímu promytí PAB i při použití 5mM tetraboritanu sodného. Borátový anion ale není až tak silnou Lewisovou bází,

proto byl výsledek eluce příznivější. Taktéž bylo zjištěno, že k největší adsorpci borátu dochází při pH = 9, naopak při pH = 4,7 je nízká. Proto v našem případě nedošlo k tak velké interferenci s analyzovanou látkou, jako tomu bylo u fosfátového pufru (36).

5.1.2 HILIC podmínky

Kondicionace byla provedena 1 ml 98% acetonitrilu. Poté se nanoslo 150 µl vzorku, promylo 1 ml 98% acetonitrilu či 1 ml vody a eluováno bylo 2 ml amoniaku či 2 ml acetonitrilu.

Současně byl připraven vzorek pro porovnání při analýze pomocí HPLC sestávající ze složek, které by se měly nacházet v eluátu, tzn. analyzované látky a činidlo použité pro eluci.

TiO₂

V pokusech na TiO₂ s HILIC podmínkami jsme nejprve porovnávali dva druhy elučních činidel. Kondicionaci a promytí jsme provedli 98% ACN, jenž vznikl naředěním 100% acetonitrilu 5mM octanovým pufrům o pH 4,7. K eluci jsme v jednom případě použili 5% NH₃ naředěný acetonem a v případě druhém 50% ACN.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát získaný vymytím látek amoniakem byl vysušen proudem dusíku a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. Vzorek po eluci 50% ACN byl v odměrné baňce doplněn vodou na 5 ml. (Tab. 12)

Tab. 12. Retence látek na TiO₂ při použití různých elučních činidel

analyt	promytí	eluce 5% NH ₃	eluce 50% ACN
PAB	71 %	38 %	30 %
PHB	32 %	70 %	43 %
OHB	0 %	93 %	91 %
SAL	0 %	96 %	77 %
DIC	31 %	94 %	48 %
IBU	98 %	9 %	11 %

Kondicionace: 98% ACN+pufr(pH 4,7); **Promytí:** 98% ACN+pufr(pH 4,7); **Eluce:** 5% NH₃; 50% ACN

98% organické složky v promývacím činidle zajistilo podmínky k vymytí pouze PAB a IBU. Ostatní látky byly detekovány až v eluátu. V případě, kdy byl pro eluci použit 5% NH₃, bylo dosaženo lepších výsledků než tomu bylo při eluci 50% ACN.

Dále jsme zkoušeli použít 98% ACN, jenž byl ze 100% ACN naředěn vodou, nikoli puforem. Acetonitril jsme použili k aktivaci povrchu TiO₂ a v prvním případě i v promývací fázi. V druhém případě jsme pro porovnání promývali vodou. V obou pokusech jsme látky ze sorbentu vymývali 50% ACN.

Vzorek po promytí byl upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Eluát byl v odměrné baňce doplněn vodou na 5 ml. (Tab. 13)

Tab. 13. Retence látek na TiO₂ za použití různých promývacích činidel

analyt	promytí 98% ACN	eluce	promytí vodou	eluce
PAB	4 %	90 %	96 %	3 %
PHB	0 %	93 %	97 %	4 %
OHB	0 %	90 %	92 %	6 %
SAL	0 %	90 %	90 %	7 %
DIC	36 %	54 %	94 %	5 %
IBU	56 %	38 %	92 %	5 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; voda; **Eluce:** 50% ACN

Při promývání 98% ACN vykazovala většina složek vzorku retenci. Eluce 50% ACN navodila podmínky, kdy došlo k eluci především PAB, PHB, OHB a SAL. U pokusu s vodou jako promývacím činidlem bylo dosaženo podobného efektu jako v prvně provedených pokusech na TiO₂ ve vodném prostředí, kdy při promytí vodou došlo k přerušení vazeb mezi všemi analyzovanými látkami a sorbentem.

ZrO₂

V HILIC podmínkách jsme na ZrO₂ také nejprve vyzkoušeli pro eluci 5% NH₃ (ředěný acetonem). 98% ACN (ředěný vodou) jsme použili jak pro aktivaci povrchu, tak v promývací fázi.

Vzorek po promytí byl upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 14)

Tab. 14. Retence látek na ZrO₂ v HILIC módu při eluci NH₃

analyt	promytí	eluce
PAB	0 %	92 %
PHB	1 %	86 %
OHB	0 %	109 %
SAL	0 %	68 %
DIC	11 %	95 %
IBU	0 %	73 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 5% NH₃

Výsledky jsou podobné jako při provedení přibližně stejného pokusu na TiO₂ (kde byl ale ACN ředěn puforem) s tím rozdílem, že zde na ZrO₂ byly lépe eluovány také látky PAB a IBU.

Poté jsme zkoušeli vliv množství organické složky v promývacím činidle. Povrch jsme kondicionovali opět 98% ACN, k promytí jsme použili postupně 98%, 80% a 50% ACN. Eluci jsme provedli 50% ACN. (Tab.15)

Tab. 15. Vliv množství organické složky v promývacím činidle na retenci u ZrO₂

analyt	promytí	eluce	promytí	eluce	promytí	eluce
	98% ACN		80% ACN		50% ACN	
PAB	0 %	90 %	86 %	12 %	100 %	4 %
PHB	0 %	88 %				
OHB	0 %	93 %				

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98%; 80%; 50% ACN; **Eluce:** 50% ACN

Podobných výsledků při stejných podmínkách jako u TiO₂ bylo dosaženo i v pokusech na ZrO₂. Tedy že při promývání 98% ACN vykazovaly látky spíše retenci a k žádané eluci došlo při nanesení činidla s 50% organické složky.

Promytí činidlem obsahujícím menší procento organické složky (80% či 50% ACN) jsou opět navozeny podmínky pro vymytí kyseliny z povrchu ZrO₂. Tento trend jsme pozorovali na PHB. Výsledky odpovídají již provedeným experimentům zkoumající vliv koncentrace ACN na retenci derivátů kyseliny benzoové (37, 38).

Zkusili jsme v tomto uspořádání místo ACN promýt kolonky také vodou, které se u ZrO₂ dříve osvědčilo (kondicionace 98% ACN, eluce 50% ACN). Pokus jsme provedli pouze s kyselinami PAB a PHB, jež byly při těchto podmínkách z větší části eluovány: PAB ze 79 %, PHB z 59 %. Výsledky odpovídají teorii, kde 98% organické

složky (ACN) navodí podmínky, při nichž je zajištěna větší retence těchto dvou kyselin, a kde 50% množství ACN naopak vytváří prostředí pro přerušení vzniklých vazeb mezi látkami a sorbentem.

Dále jsme k promytí, ale také ke kondicionaci vyzkoušeli 95% ACN. Eluci jsme provedli opět 50% ACN. Vzorek po promytí byl upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml a eluát byl doplněn v odměrné baňce vodou na 5 ml. (Tab. 16)

Tab. 16. Retence látek na ZrO₂ za použití 95% ACN

analyt	promytí	eluce
PAB	18 %	79 %
PHB	7 %	85 %
OHB	0 %	102 %
SAL	2 %	87 %
DIC	96 %	4 %
IBU	95 %	0 %

Kondicionace: 95% ACN; **Promytí:** 95% ACN; **Eluce:** 50% ACN

Při promytí 95% ACN došlo opět k retenci většiny látek – PAB, PHB, OHB, SAL, které byly eluovány 50% ACN. Pro diklofenak a ibuprofen byla již 95% koncentrace organické složky dostačující k jejich přerušení vazeb mezi pevnou fází ZrO₂ a byly tak detekovány v promývací fázi.

Na závěr jsme v HILIC podmínkách na ZrO₂ zkoumali efekt množství organické složky v elučním činidle. Ke kondicionaci a v promývací fázi jsme na základě předešlých výsledků použili 98% ACN. Eluční fázi jsme v tomto případě modifikovali tak, že jsme v pokusech pro vymytí analytů použili 2 x 2 ml 40% ACN (Tab. 17), 50% ACN (Tab. 18), 60% ACN (Tab. 19) a u všech nakonec ještě 1 ml NH₃.

Vzorky po promytí byly upraveny v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a doplněn vodou na 5 ml. Vzorky po eluci ACN příslušné koncentrace byly doplněny v odměrné baňce vodou na 5 ml. Vzorky po eluci 5% NH₃ byly vysušeny dusíkem a následně upraveny v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody.

Tab. 17. Retence látek na ZrO₂ po následných elucích 40% ACN

analyt	eluce 40% ACN	eluce 40% ACN	eluce 5% NH ₃
PAB	89 %	11 %	3 %
PHB	94 %	11 %	5 %
OHB	16 %	3 %	63 %
SAL	42 %	10 %	45 %
DIC	100 %	0 %	0 %
IBU	98 %	0 %	0 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 40% ACN + 40% ACN + 5% NH₃

Tab.18. Retence látek na ZrO₂ po následných elucích 50% ACN

analyt	eluce 50% ACN	eluce 50% ACN	eluce 5% NH ₃
PAB	97 %	9 %	6 %
PHB	98 %	9 %	4 %
OHB	16 %	3 %	66 %
SAL	37 %	17 %	42 %
DIC	104 %	0 %	0 %
IBU	107 %	0 %	0 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 50% ACN + 50% ACN + 5% NH₃

Tab. 19. Retence látek na ZrO₂ po následných elucích 60% ACN

analyt	eluce 60% ACN	eluce 60% ACN	eluce 5% NH ₃
PAB	96 %	4 %	2 %
PHB	97 %	5 %	2 %
OHB	16 %	4 %	51 %
SAL	45 %	15 %	31 %
DIC	100 %	0 %	0 %
IBU	100 %	0 %	0 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 60% ACN + 60% ACN + 5% NH₃

K eluci největšího množství většiny látek došlo hned po prvním nanesení 2 ml 40%, 50%, či 60% elučního činidla. Stalo se tak u PAB, PHB, DIC a IBU.

K eluci kyseliny 2,4-dihydroxybenzoové a kyseliny salicylové bylo zapotřebí větší množství x% ACN a následně i použití 5% NH₃. Příčinou by mohla být struktura těchto dvou látek, která polohou hydroxylové a karboxylové skupiny. Sousední poloha těchto dvou funkčních skupin má nejspíš za následek vytvoření komplexu podobné pevnější vazby na sorbent. Studie zabývající se chromatografií derivátů kyseliny benzoové také poukazuje na fakt, že ty deriváty, jejichž substituenty typu silných

Lewisových bází (např. COOH, OH nebo primární alifatická NH₂) v ortho poloze vůči karboxylové funkci, jsou sorbentem ZrO₂ zadržovány více než jim odpovídající para izomery (39).

5.2 Stacionární fáze na bázi ZrO₂, ZrO₂-SAX, TiO₂, SiO₂ – plazma

5.2.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí

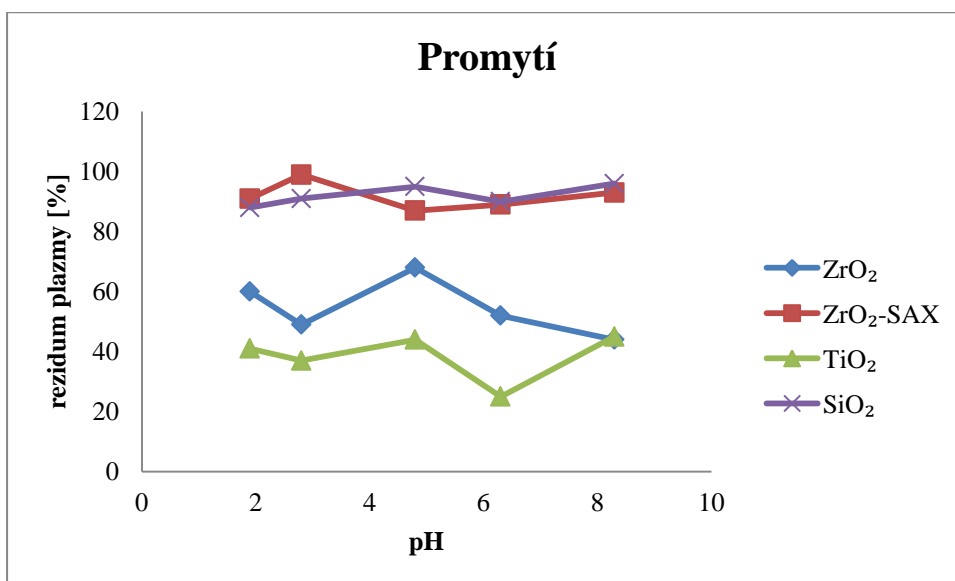
Kondicionace byla provedena 1 ml příslušného pufru. Poté se nanoslo 150 µl vzorku, promylo 1 ml příslušného pufru a bylo eluováno 2 ml 5% amoniaku.

Současně byl připraven vzorek pro porovnání při analýze pomocí spektrofotometru sestávající ze složek, které by se měly nacházet v eluátu, tzn. plazma a činidlo použité pro eluci.

Než jsme začali s pokusy se vzorky modelových látek rozpuštěných v plazmě, provedli jsme malý výzkum se samotnou plazmou. Cílem bylo určit vhodné sorbenty, na kterých nedochází k výrazné retenci plazmy v promývací fázi.

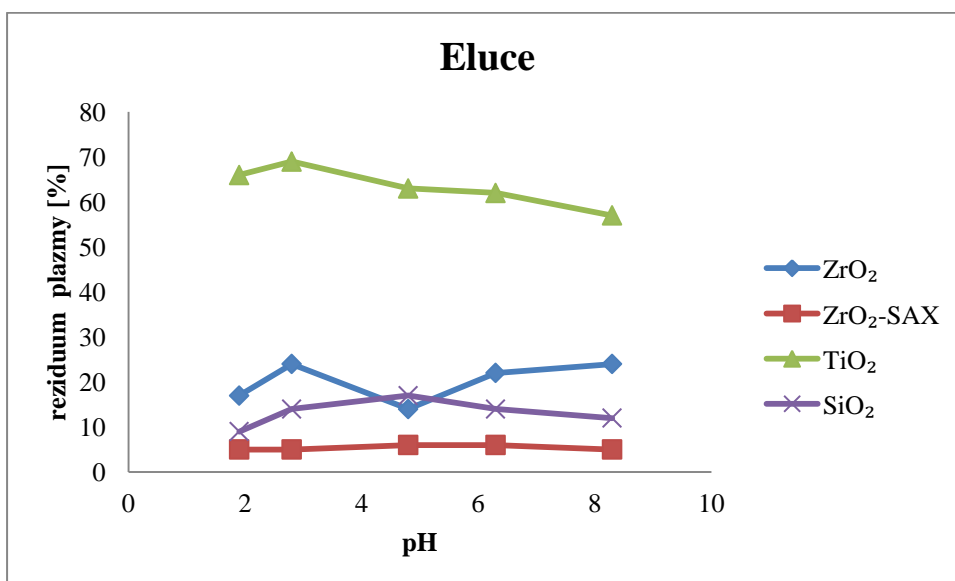
Experiment jsme uskutečnili ve vodném prostředí o různém pH. Ke kondicionaci a promytí jsme postupně použili pufrы s pH 2,0 (0,1% TFA), 2,7 (5mM HCOONH₄), 4,7 (5mM CH₃COONH₄), 6,3 (5mM MES), 8,3 (5mM TRIS). Eluci jsme provedli 5% NH₃. Vzorky po promytí a po eluci byly v odměrné baňce doplněny vodou na 5 ml. Analýza vzhledem k povaze výsledků probíhala na spektrofotometru. Přítomnost plazmy po promytí (Graf 1) a po eluci (Graf 2) byly měřeny při vlnové délce 278 nm.

Graf 1. Vliv pH na množství rezidua plazmy ve vzorcích po promytí



Kondicionace: pufr-pH 2,0; 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Promytí:** pufr-pH 2,0; 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Eluce:** 5% NH₃

Graf 2. Vliv pH na množství rezidua plazmy ve vzorcích po eluci



Kondicionace: pufr-pH 2,0; 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Promytí:** pufr-pH 2,0; 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Eluce:** 5% NH₃

Nejllepších výsledků při experimentech se samotnou plazmou jako vzorkem bylo dosaženo s pevnou fází ZrO₂-SAX, konkrétně při pH 2,7. Podobně tomu bylo pro porovnání i u sorbentu SiO₂. Z toho plyne, že pro očištění vzorků s biologickým materiálem, v našem případě s plazmou, by mohl být vhodným sorbentem ZrO₂ s úpravou povrchu ve funkci silného aniontového měniče. Tento předpoklad jsme se dále pokusili ověřit ve vzorcích s plazmou a modelovými látkami.

5.3 Stacionární fáze na bázi ZrO₂, ZrO₂-SAX, TiO₂ - vzorek s plazmou

5.3.1 Retence polárních látek ve vodném prostředí

Kondicionace byla provedena 1 ml pufru či 1 ml vody. Poté se nanoslo 150 µl vzorku, promylo 1 ml pufru či 1 ml vody a elovalo 1,5 ml amoniaku.

Současně byl připraven vzorek sestávající ze složek, které by se měly nacházet v eluátu, tzn. analyzované látky a činidlo použité pro eluci.

ZrO₂

Největší množství plazmy bylo na ZrO₂ promyto při pH 4,7. Pro experiment komplikovanějšího vzorku analytů s plazmou jsme tedy zvolili prostředí o tomto pH. Nejprve jsme pokus provedli se vzorkem obsahujícím všechny látky dohromady a s plazmou v koncentraci 1 : 10. Poté jsme zkusili rozdělit do dvou vzorků obsahujících po třech zvlášť kyseliny PAB, PHB, OHB a SAL, DIC, IBU, opět s plazmou v koncentraci 1 : 10. Nakonec jsme chtěli zjistit vliv množství plasmy na separační schopnost ZrO₂, a tak jsme uskutečnili experiment s plazmou v koncentraci 1 : 1, kde byly opět látky PAB, PHB, OHB a SAL, DIC, IBU zvlášť ve dvou vzorcích. Sorbent jsme tedy aktivovali 5mM octanovým pufrem a po nanesení vzorku jsme jej promyli vodou. K eluci kyselin jsme použili 5% NH₃ ředěný acetonem.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen proudem dusíku a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 20)

Tab. 20. Retence látek na ZrO₂ v biologickém vzorku při pH 4,7

analyt	plasma : vzorek 1 : 10 <i>PAB, PHB, OHB, SAL, DIC, IBU dohromady</i>		plasma : vzorek 1 : 10 <i>PAB, PHB, PHB a SAL DIC, IBU zvlášť</i>		plasma : vzorek 1 : 1 <i>PAB, PHB, PHB a SAL DIC, IBU zvlášť</i>	
	promytí	eluce	promytí	eluce	promytí	eluce
PAB	58 %	19 %	0 %	88 %	26 %	72 %
PHB	60 %	21 %	0 %	92 %	26 %	58 %
OHB	39 %	37 %	0 %	83 %	16 %	68 %
SAL	46 %	27 %	0 %	83 %	31 %	59 %
DIC	36 %	44 %	0 %	109 %	37 %	73 %
IBU	39 %	10 %	0 %	82 %	40 %	42 %

Kondicionace: pufr o pH 4,7; **Promytí:** voda; **Eluce:** 5% NH₃

Nanesení modelových kyselin nacházející se dohromady v jednom vzorku tak, jak jsme to doposud praktikovali, nepřineslo takové výsledky jako v případě stejného pokusu se ZrO₂ bez přítomnosti plazmy v roztoku analytu. Vyšší procentuální výtěžky při eluci byly tedy získány při nanesení zvlášť PAB, PHB, OHB v jednom vzorku a zvlášť SAL, DIC, IBU ve druhém vzorku.

Vyšší koncentrace plazmy ve vzorku byla pravděpodobně příčinou snížení extrakční účinnosti a výtěžnosti. Plazma v této koncentraci pravděpodobně interferovala s povrchem ZrO₂, zabránila tak pevnějšímu navázání látek, jako tomu bylo při její nižší koncentraci ve vzorku.

ZrO₂-SAX

Vycházejíc z výsledků experimentu se samotnou plazmou, podle kterých by měl nejvíce pro očištění vzorku od plazmy vyhovovat sorbent ZrO₂-SAX, jsme se pokusili tento fakt vyzkoušet na vzorcích kyselin PAB, IBU a zásad ATE a PRO, které byly v roztocích s plasmou nanášeny samostatně, přičemž jsme zkoumali vliv různého pH.

Pokusy proběhly za kondicionace a promytí pomocí pufrů s pH 2,7 (5mM HCOONH₄); 4,7 (5mM CH₃COONH₄); 6,3 (5mM MES); 8,3 (5mM TRIS). Eluce byla provedena 5% NH₃, ředěným acetonem. Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen proudem dusíku a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 21)

Tab. 21. Retence látek na ZrO₂-SAX v biologickém vzorku při různém pH

pH	PAB		IBU		ATE		PRO	
	promytí	eluce	promytí	eluce	promytí	eluce	promytí	eluce
2,7	54 %	18 %	37 %	33 %	30 %	0 %	39 %	0 %
4,7	2 %	108 %	9 %	136 %	41 %	0 %	100 %	0 %
6,3	3 %	80 %	23 %	52 %	36 %	0 %	64 %	0 %
8,3	7 %	72 %	15 %	100 %	61 %	0 %	80 %	0 %

Kondicionace: pufr o pH 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Promytí:** pufr o pH 2,7; 4,7; 6,3; 8,3; **Eluce:** 5% NH₃

K nejlepší eluci zástupců kyselých látek, PAB a IBU, došlo při pH 4,7 a 8,3. U PAB také při pH 6,3. Kyseliny vzhledem k jejich pK_a při těchto pH mají na svém povrchu víceméně vyrovnaný náboj, se zvyšujícím se pH pak náboj záporný. Tento typ sorbentu je aniontový výměník, kyseliny byly na pevnou fázi ukotveny nejspíše především pomocí iontové vazby při vhodném pH.

Při takto zvolených hodnotách pH byly bazické látky ATE a PRO vzhledem k jejich pK_a nabitý kladně. Došlo tedy převážně k jejich vymytí a neukotvení na povrchu ZrO₂-SAX. Stalo se tak kvůli vzájemnému odpuzení díky přítomnému kladnému náboji jak na straně bazických látek, tak na straně sorbentu.

Prostředí s pH 4,7 se opět osvědčilo, zkusili jsme tedy na druhou stranu otestovat různé typy pufrů nastavených na tuto hodnotu pH. Ke kondicionaci a promytí jsme použili 5mM MES, 5mM (NH₄)₃PO₄ a 5mM Na₂B₄O₇. Pro porovnání jsme provedli i pokus s vodou použitou opět jak ve fázi aktivace povrchu, tak i v promývací fázi. Ve všech případech jsme eluci prováděli pomocí 5% NH₃ ředěným acetonem.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. Jako modelovou látku jsme zvolili kyselinu p-aminobenzoovou. (Tab. 22)

Tab. 22. Retence PAB na ZrO₂-SAX v biol. vzorku s použitím různých pufrů s pH 4,7

analyt	čínidlo	promytí	eluce
PAB	voda	1 %	97 %
	MES	2 %	96 %
	fosforečnan amonný	56 %	14 %
	tetraboritan sodný	32 %	48 %

Kondicionace: voda/různé pufrы s pH 4,7; **Promytí:** voda/různé pufrы s pH 4,7; **Eluce:** 5% NH₃

Voda jako kondicionační a promývací činidlo navodila vhodné podmínky pro navázání PAB na ZrO₂-SAX. Podobně tomu bylo i u 5mM MES, jakožto nevhodnějšího pufru pro udržení pH 4,7.

Fosforečnanový ani tetraboritanový pufr nebyly opět indiferentní ani při tomto experimentu na ZrO₂-SAX. V tomto případě se krom pevnější ligandové vazby ve prospěch fosfátového a boritanového aniontu (na úkor PAB) uplatnila na tomto typu sorbentu nejspíše i silnější iontová vazba.

Na základě výborných výsledků PAB v prostředí vody jsme pro úplnost provedli pokus také s látkami SAL, DIC, IBU, sorbent jsme tedy aktivovali a poté i promývali vodou, elučním činidlem byl 5% NH₃ ředěný acetonem. Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 23)

Tab. 23. Retence látek na ZrO₂-SAX v biologickém vzorku v prostředí vody

analyt	promytí	eluce
SAL	2 %	73 %
DIC	18 %	57 %
IBU	32 %	57 %

Kondicionace: voda; **Promytí:** voda; **Eluce:** 5% NH₃

U kyselin SAL, DIC, IBU již ale nebylo dosaženo ideálních výsledků eluce zbylých kyselých látek při užití vody pro kondicionaci a promytí po vzoru předešlého experimentu.

5.3.2 HILIC podmínky

Kondicionace byla provedena 1 ml 98% acetonitrilu. Poté se nanoslo 150 µl vzorku, promylo 1 ml 98% acetonitrilu či 1 ml vody a eluováno 2 ml amoniaku či 2 ml acetonitrilu.

Současně byl připraven vzorek pro porovnání při analýze pomocí HPLC sestávající ze složek, které by se měly nacházet v eluátu, tzn. analyzované látky a činidlo použité pro eluci.

ZrO₂-SAX

V experimentu pro ověření separačních schopností ZrO₂-SAX v HILIC podmínkách jsme použili 98% ACN k aktivaci povrchu a poté i k promytí naneseného vzorku s látkami PAB a IBU, které jsme následně vymývali 5% NH₃ ředěným acetonem. Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl vysušen dusíkem a následně upraven v odměrné baňce přidáním 500 µl acetonitrilu a 500 µl vody. (Tab. 24)

Tab. 24. Retence látek v HILIC na ZrO₂-SAX

analyt	promytí	eluce
PAB	55 %	56 %
IBU	68 %	20 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 5% NH₃

Procentuální výtěžnost při HILIC podmínkách na ZrO₂-SAX u vzorku s plazmou není ideální. Již samotný acetonitril není indiferentní vůči plazmě a způsobil její vysrážení ze vzorku.

TiO₂

Na rozdíl od experimentu na ZrO₂-SAX v HILIC uspořádání jsme u TiO₂ látky ze sorbentu vymývali 50% ACN. Kondicionace a promytí byly provedeny stejnými rozpouštědly - 98% ACN. Zde jsme m.j. také zkoušeli účinnost použitých kolonek s regenerovaným sorbentem v porovnání s nově připravenými kolonkami s TiO₂. Na regenerované kolonky jsme nanášeli vzorek s plazmou obsahující látky PAB, PHB, OHB a SAL, DIC, IBU dohromady, na nové kolonky pak PAB, PHB, OHB a SAL, DIC, IBU zvlášť ve dvou vzorcích.

Vzorek po promytí byl v odměrné baňce doplněn mobilní fází A na 5 ml. Eluát byl v odměrné baňce doplněn vodou na 5 ml. (Tab. 25)

Tab. 25. Retence látek v biologickém vzorku na TiO₂

analyt	<i>regenerované kolonky</i>	<i>nové kolonky</i>	
	PAB, PHB, OHB, SAL DIC, IBU dohromady	PAB, PHB, OHB a SAL, DIC IBU zvlášť	
	eluce	promytí	eluce
PAB	64 %	80 %	21 %
PHB	80 %	62 %	38 %
OHB	91 %	4 %	95 %
SAL	75 %	9 %	89 %
DIC	21 %	75 %	17 %
IBU	9 %	88 %	0 %

Kondicionace: 98% ACN; **Promytí:** 98% ACN; **Eluce:** 50% ACN

HILIC podmínky na TiO₂ pro vzorek s plazmou přinesly o něco lepší výsledky v porovnání se ZrO₂-SAX, kde jsme ale testovali pouze kyseliny PAB a IBU.

V porovnání účinnosti metody na použitých a nových kolonkách vyšly nejlépe OHB a SAL, kdy na nových kolonkách byla eluční výtěžnost pro tyto dvě látky o něco vyšší. Naopak PAB a PHB měly lepší výsledky v pokusu na regenerovaných kolonkách.

6. Závěr

Snažili jsme se ověřit a především vyhodnotit vliv různých experimentálních podmínek na extrakci kyselých analytů. Předpoklad výhodnějších vlastností jsme zkoušeli na sorbentech TiO_2 a ZrO_2 . V módu s retencí polárních látek ve vodném prostředí se oxid zirkoničitý jevil jako vhodnější pevná fáze pro extrakci všech modelových kyselin eluovaných 5% NH_3 v prostředí s pH 4,7 za použití nejlépe octanového či MES pufru. Modelové látky na TiO_2 byly vodným prostředím vymyty z povrchu v promývací fázi. HILIC podmínky opět lépe svědčili ZrO_2 , kdy byla extrakční výtěžnost většiny analytů poměrně vysoká, a to jak při eluci 5% NH_3 , tak 50% ACN. Ověřili jsme vliv různých koncentrací organické složky na retenci kyselin. Na TiO_2 v HILIC prostředí byly modelové kyseliny detekovány v eluční fázi, ne však v takové míře jako na ZrO_2 .

Následně jsme studovali potenciál stacionárních fází ZrO_2 , ZrO_2 -SAX a TiO_2 pro selektivní extrakci účinných látek z komplikované matrice, v našem případě biologického vzorku s plazmou. Pro lepší výtěžnost extrakce ve vodném prostředí na ZrO_2 s neupraveným povrchem bylo zapotřebí, aby byly nanášené látky PAB, PHB, OHB a SAL, DIC, IBU zvlášť ve dvou vzorcích. Na ZrO_2 -SAX v pokusu s analyty PAB, IBU, ATE a PRO došlo po eluci 5% NH_3 k vymytí ze sorbentu pouze kyselých látek. Vodné prostředí za použití pufrů v pokusu pro PAB bylo opět nejvhodnější při pH 4,7 za použití nejlépe octanového či MES pufru. HILIC prostředí na ZrO_2 -SAX pro takto složitý vzorek již nebyly příliš ideální. Na TiO_2 ze všech modelových analytů došlo k žádané eluci pomocí 50% ACN pouze OHB a SAL.

Jedná se o jedny z prvních měření, která poskytla přehled o chování pevných fází na bázi TiO_2 , ZrO_2 a ZrO_2 -SAX především vzhledem ke kyselým látkám v různých podmínkách a uspořádáních SPE metody.

7. Zdroje

1. MOKRÝ, M. Přednášky z předmětu Monitorování lékových hladin. Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv. UK v Praze, Farmaceutická fakulta v HK. Ak. r. 2012/2013.
2. MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Vol. 162. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, Inc., 458 s. ISBN 0-471-32845-6. [online] (2003) [cit. 2014-08-04], dostupné z:
<[http://www.3gnow.ru/other/DVD-010/Mitra_S._\(ed.\)_Sample_Preparation_Techniques_in_Analytical_Chemistry_\(2003\)\(en\)\(458s\).pdf](http://www.3gnow.ru/other/DVD-010/Mitra_S._(ed.)_Sample_Preparation_Techniques_in_Analytical_Chemistry_(2003)(en)(458s).pdf)>
3. ALTUN, Z. New Techniques for Sample Preparation in Analytical Chemistry. Karlstad, Karlstad University Studies 2005:24. Sweden: Universitetstryckeriet, Karlstad. 34 s. ISSN 1403-8099. ISBN 91-85335-65-7. [online] (2005) [cit. 2014-04-08], dostupné z:
<<http://kau.diva-portal.org/smash/get/diva2:5262/FULLTEXT01.pdf>>
4. NAMIEŚNIK, J.; SZEFER, P. Preparing samples for analysis – The key to analytical succes. Ecological chemistry and engineering S. 2008, Vol. 15, No.2, s. 168-244. [online] (2008) [cit. 2014-04-08], dostupné z:
<[http://tchie.uni.opole.pl/freeECE/S_15_2/Namiesnik_15\(S2\).pdf](http://tchie.uni.opole.pl/freeECE/S_15_2/Namiesnik_15(S2).pdf)>
5. ČAJKA, T. Liquid chromatography and sample pretreatment. Vysoká škola chemicko-technologická. [online] (2014) [cit. 2014-04-08], dostupné z:
<http://web.vscht.cz/~cajkat/doc/ABAPL/ABAPL_07.pdf>
6. Supelco. Guide to Solid Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co. [online] (1998) [cit. 2014-04-08], dostupné z:
<<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>>

7. BEHMÜLLER, R.; FORSTENLEHNER, I. C.; TENHAKEN, R.; HUBER, Ch. G. Quantitative HPLC-MS analysis of nucleotide sugars in plant cells following off-line SPE separation. *Anal Bioanal Ch.*, DOI 10.1007/s00216-014-7746-3. [online] (2014) [cit. 2014-04-08], dostupné z: <http://download.springer.com/static/pdf/611/art%253A10.1007%252Fs00216-014-7746-3.pdf?auth66=1397127999_c67e4c1fe483e9b180db243979d39b70&ext=.pdf>
8. Sigma-Aldrich. SPE kolonky Supelclean ENVI. [online] (2014) [cit. 2014-04-08], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/02.pdf>>
9. Sigma-Aldrich. Extrakce na tuhou fázi. [online] (2014) [cit. 2014-04-29], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>>
10. MACHEREY-NAGEL. SPE CATALOGUE. Watrex Praha s.r.o. [online] (2014) [2014-04-29], dostupné z: <http://www.watrex.cz/watrex/cz/dwn_ds.php?id=MACHEREY_NAGEL_SPE_CATALOGUE.pdf>
11. Supelco. Visiprep Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds, Product Specification. Sigma-Aldrich Co. 1999.
12. Sigma-Aldrich. VisiprepTM SPE Vacuum Manifold. [online] (2014) [cit. 2014-04-07], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/57030u?lang=en®ion=CZ>>
13. Analytical Techniques in Aquaculture Research. Extraction and separation of fats and lipids. [online] (2013) [2013-09-23], dostupné z: <http://www.aquaculture.ugent.be/Education/coursematerial/online%20courses/ATA/analysis/lip_extr.htm>
14. Supelco. Discovery ProductProfile. Sigma-Aldrich Co. 2002.
15. LENÍČEK, J.; NOVOTNÁ RYCHTECKÁ, A. Grafitický uhlík jako selektivní sorbent pro extrakci organických látek. Zdravotní ústav, Ústí nad Labem. Sigma-Aldrich Co. [online] (2014) [cit. 2014-04-08], dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13660/09.pdf>>
16. Phenomenex, Inc. SPE Reference Manual & Users Guide, 2011. Gen-Lab Kft. [online] (2011) [cit. 2014-04-08], dostupné z:

- <<http://www.gen-lab.hu/dokumentumok/speusers.pdf>>
17. Leatherhead Food Research. Sample Preparation Techniques for the Determination of Mycotoxins. [online] (2013) [cit. 2013-09-23], dostupné z: <<http://services.leatherheadfood.com/eman/FactSheet.aspx?ID=61>>
 18. Supelco. Application Note 165. Sigma-Aldrich Co. 2000.
 19. Supelco. Instructions for Using Discovery Solid Phase Extraction Tubes. Sigma-Aldrich Co. 2001.
 20. POUSTKA, J. SPE. Vysoká škola chemicko-technologická. [online] (2014) [cit. 2014-04-11], dostupné z: <http://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM_SPE_99.pdf>
 21. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; McCORMICK, A.; CARR, P.W. Part I. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chrom. A.* 2004, 1028, s. 1-30.
 22. GRÜN, M.; KURGANOV, A. A.; SCHACHT, S.; SCHÜTH, F.; UNGER, K. K. Comparison of an ordered mesoporous aluminosilicate, silica, alumina, titania and zirconia in normal-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A.* 1996, 740, s. 1-9.
 23. DOUŠA, M. a kol. Adsorbenty a chemicky vázané fáze. [online] (2013) [cit. 2013-10-01], dostupné z: <<http://www.hplc.cz/Teorie/adsorbent.html>>
 24. KLIMEŠ, J. a kolektiv. Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami. 1. vydání. Hradec Králové: RNDr. František Skopec, CSc Nucleus HK[®], 2011. 268 s. ISBN 978-80-87009-29-1.
 25. HANAHA, T.. A comprehensive review of techniques for biofunctionalization of titanium. *J. Periodontal Implant Sci.* 41(6):263-272. [online] (2011) [cit. 2014-04-08], dostupné z: <<http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.5051/jpis.2011.41.6.263&vmode=PUBREADER#!po=22.0000>>
 26. NAWROCKI, J.; DUNLAP, Ch. J.; CARR, P. W.; BLACKWELL, J. A. New Materials for Biotechnology: Chromatographic Stationary Phases Based on Zirconia. *Biotechnol. Prog.* 1994, 10, s. 561-573.
 27. BLACKWELL, J. A.; CARR, P. W. Development of an Eluotropic Series for the Chromatography of Lewis Bases on Zirconium Oxide. *Anal. Chem.* 1992, 64, s. 863-873.

28. HU, Yu-Ling; FENG, Yu-Qi; WAN, Jian-Di; DA, Shi-Lu. Comparison of chromatographic properties of lewis base-modified mixed oxides as stationary phases for HPLC. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 2002, 25(1), s. 83-99.
29. ZirChrom Separations, Inc. ZirChrom[®]-SAX. [online] (2014) [cit. 2014-04-08], dostupné z: <<http://www.zirchrom.com/SAX.asp>>
30. ALPERT, A. J. Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides. *Anal. Chem.* 2008, 80, s. 62-76.
31. NAWROCKI, J.; DUNLAP, C.; LI, J.; ZHAO, J.; McNEFF, C. V.; McCORMICK, A.; CARR, P. W. Part II. Chromatography using ultra-stable metal oxide-based stationary phases for HPLC. *J. Chrom. A.* 2004, 1028, s. 31-62.
32. JANDERA P., HILIC chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *CHEMAGAZÍN*. [online] (2011) [cit. 2014-04-09], dostupné z: <http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XI_2_cl1.pdf>
33. DOUŠA, M. a kol. Hydrofilní interakční chromatografie – HILIC. [online] (2014) [cit. 2014-04-09], dostupné z: <<http://www.hplc.cz/Teorie%5Chilic.html>>
34. Drugbank. Open Data Drug & Drug Target Database. [online] (2014) [cit. 2014-04-30], dostupné z: <<http://www.drugbank.ca/>>
35. WALKER, E. B. Amino ester local anesthetics. Weber State University. [online] (2014) [cit. 2014-02-22], dostupné z: <http://faculty.weber.edu/ewalker/Medicinal_Chemistry/topics/Psycho/local_a_ester.htm>
36. NAWROCKI, J.; RIGNEY, M. P.; McCORMICK, A.; CARR, P.W. Chemistry of zirconia an its use in chromatography. *J. Chrom. B.* 1993, 657, s. 229-282.
37. KUČERA, R.; KOVŘÍKOVÁ, P.; KLIVICKÝ, M.; KLIMĚŠ, J. The retention behaviour of polar compounds on zirconia based stationary phases under hydrophilic interaction liquid chromatography conditions. *J. Chrom. A.* 2011, 1218, s. 6981-6986.

38. KALAFUT, P.; KUČERA, R.; KLIMEŠ, J.. The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes on an organic rich mobile phase. *J. Chrom. A.* 2012, 1232, s. 242-247.
39. BLACKWELL, J. A.; CARR, P. W. The Role of Lewis Acid-Base Processes in Ligand-Exchange Chromatography of Benzoic Acid Derivatives on Zirconium Oxide. *Anal. Chem.* 1992, 64, s. 853-862.