

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**VÝVOJOVÉ TRENDY V SEKVENČNÍ  
INJEKČNÍ CHROMATOGRAFII**

**Habilitační práce**

(Soubor publikovaných vědeckých prací doplněný komentářem)

2019

PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.



## Poděkování

V první řadě bych rád poděkoval za to, že mám to štěstí pracovat na Katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovi. Děkuji prof. RNDr. Petrovi Solichovi, CSc. a doc. RNDr. Daliborovi Šatínskému za odborné vedení, umožnění profesního růstu, pomoc a motivaci během práce na katedře. Děkuji prof. RNDr. Jaromírovi Růžičkovi, Ph.D. za obrovskou motivaci, předání velkého množství zkušeností, a nezměrnou a neutuchající práci při studiu dějů v průtoku.

Díky patří Luce, Daliborovi Šatínskému, Hance Sklenářové, Burkhardovi Horstkotte, Pavlovi Jáčovi, Ivaně Horstkotte Šrámkové, Lucii Novákové, Haně Kočové Vlčkové a Jurajovi Lenčovi za to, že s nimi mohu spolupracovat a konzultovat mé snahy v analytické chemii, a také sdílet každodenní radosti a úskalí rozmanité práce na katedře. Můj dík patří také nestorům katedry prof. Karlíčkovi, doc. Pospíšilové a doc. Poláškoví, a také všem ostatním členům katedry za kolegiální a spolupráci.

Díky prof. M. C. B. S. M. Montenegro a Dr. C. G. Amorim z University v Portu za jejich vedení na první zahraniční stáži, která mě naučila velké samostatnosti a práci mimo domácí prostředí. Dr. I. Lähdesmäki, který byl a dodnes je perfektním parťákem při výzkumu a vývoji. Dr. M. Grand a Dr. M. Hatta nejen za lekce chemické oceánografie na druhém konci světa. Prof. C. Measures a prof. P. Worsfold za jejich nezištné přijetí do laboratoře a obrovské zkušenosti přesahující vědu.

Můj největší dík patří mým rodičům za podporu ve všem co dělám a sestře Markétě za prošlapávání životních cest. Luce a Adámkovi děkuji za to, že jsou mou energií a že mi umožnili sepsat tuto práci. Za podporu, nápady, odborné i neodborné konzultace, a také za pomoc při sepsování této práce bych chtěl poděkovat právě mé manželce Luce. Dík patří také dalším členům rodiny.

Rád bych poděkoval také Lukášovi Červenému za přátelství, podporu a pomoc při řešení pracovních a životních situací během doktorského studia a v průběhu vědecké kariéry.

Děkuji grantovým agenturám FRVŠ, GAUK a GAČR, projektům MŠMT Kontakt II LH, STARSS a EFSA-CDN a Farmaceutické fakultě UK za finanční podporu mé práce a za možnost prezentovat získané výsledky na zahraničních konferencích. Dále děkuji programu Erasmus a projektu FAFIS za finanční podporu mých zahraničních pobytů.

Děkuji firmě FIALab Instruments dlouholetou spolupráci a podporu vývoje bez které by metoda sekvenční injekční chromatografie dnes nebyla tam kde je, a firmě Global FIA v čele s Dr. G. Marshall za spolupráci na rozvoji nových konceptů v průtokových metodách.

## **Prohlášení**

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

V Hradci Králové

Petr Chocholouš

## Seznam zkratek

Pokud neexistuje obecně přijatý český ekvivalent, je uveden pouze anglický pojem.

AAS	atomová absorpční spektrometrie
AIA	all injection analysis
C18	oktadecylsilikagel
CFA	continous flow analysis – kontinuální průtoková analýza
D	dispersion coefficient – disperzní koeficient
FIA	flow injection analysis – průtoková injekční analýza
GC	plynová chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LIS	Lab-In-Syringe – laboratoř ve stříkačce
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LOC	Lab-On-Chip – laboratoř na čipu
LOV	Lab-On-Valve – laboratoř na ventilu
MCFIA	multicommutated flow injection analysis
MEPS	micro-extraction by packed sorbent
MIP	molecularly imprinted polymer – molekulárně vtištěný polymer
MPFIA	multipump flow injection analysis
MS	hmotnostní spektrometrie
MSC	multisyringe chromatography
MSFIA	multisyringe flow injection analysis
μTAS	micro total analysis system – miniaturizovaný systém pro celkovou analýzu
PEEK	polyetheretherketon
PFP	pentafluorofenylpropyl
PTFE	polytetrafluorethylen
SbFC	subcritical fluid chromatography – subkritická fluidní chromatografie
SFC	supercritical fluid chromatography – superkritická fluidní chromatografie
SIA	sequential injection analysis – sekvenční injekční analýza
SIC	sequential injection chromatography – sekvenční injekční chromatografie
SPE	solid phase extraction – extrakce na tuhou fázi
UHPLC	ultra-high performance liquid chromatography – ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## Obsah

1. Úvod .....	7
2. Cíl práce.....	8
3. Teoretická část.....	9
3.1. Úvod do průtokových metod .....	9
3.1.1. Základní vlastnosti průtokových systémů.....	9
3.1.2. Programování toku v průtokových metodách .....	14
3.1.3. Miniaturizace a automatizace .....	15
3.1.4. Rychlost analýzy a rychlost zpracování vzorků.....	16
3.1.5. Selektivita průtokových metod .....	17
3.1.6. Typické úkoly průtokových metod .....	17
3.2. Sekvenční injekční chromatografie.....	19
3.2.1. Pumpy .....	20
3.2.2. Ventily .....	23
3.2.3. Detekce .....	24
3.2.4. Záznam a zpracování dat .....	25
3.2.5. Chromatografické kolony .....	26
3.2.6. Dávkování vzorku a vzorky .....	27
3.2.7. Parametry ovládacího programu a separace.....	28
3.2.8. On-line spojení extrakce se separací.....	29
3.3. Kapalinová chromatografie.....	32
3.3.1. Chromatografické kolony .....	34
3.4. Extrakce na tuhou fázi .....	38
3.5. Extrakce z kapaliny do kapaliny .....	43
4. Komentář k publikovaným pracím .....	44
4.1. Sekvenční injekční chromatografie.....	45
4.2. Sekvenční injekční analýza využívající kolony .....	51
4.3. Sekvenční injekční analýza - ostatní aplikace.....	53
4.4. Kapalinová chromatografie a úprava vzorku .....	56
5. Diskuse .....	59
6. Shrnutí .....	61
7. Závěr.....	62
8. Použitá literatura.....	63
9. Podíl autora habilitační práce na předložených publikačních výstupech .....	71

# 1. Úvod

Analytická chemie, podobně jako jiné obory, se v posledních dekáдах intenzivně rozvíjí. Mezi její klíčové cíle stále patří kromě zvýšení citlivosti a selektivity metod i automatizace a miniaturizace vývojových a rutinních pracovních postupů nutných pro analýzu. Jednou z nejčastěji využívaných možností automatizace je analýza v průtoku nebo obecněji řečeno využití pohybu kapaliny pro potřeby analýzy. Pohybem kapaliny lze přemísťovat podle potřeby vzorky, činidla, meziprodukty a produkty z místa interakce/reakce do místa detekce. Způsobů jak pohyb kapaliny provést je velké množství, ale dají se rozdělit dle podstaty na dva – zpracování v dávkách a zpracování v průtoku. Při zpracování v dávkách je zacházeno se vzorkem během jednotlivých kroků jako s nádobou naplněnou homogenním vzorkem. Během jednotlivých kroků, např. extrakce nebo derivatizace, je po proběhlém úkonu opět výsledkem nádoba s homogenní kapalinou v rovnovážném stavu. Taková forma automatizace je spíše robotická – imitující manuální provedení procesu, ale velkou výhodou je možnost paralelního uspořádání, tedy současné zpracování více vzorků. Typickými představiteli jsou analyzátoři pro klinickou analýzu nebo zpracování vzorků ve formátu 96 jamkové destičky. Při zpracování v průtoku je využita kinetika a dynamika probíhajících procesů jak při průběhu metody tak při detekci. Protože jsou využívány přechodné stavy, eliminuje se potřeba homogenního smísení a dosažení chemicky rovnovážného stavu. Takto lze výrazně časově a objemově zefektivnit celý analytický proces. S tokem kapalin je manipulováno uvnitř úzkého kanálu (hadičky/ kapiláry) pomocí pumpy, ventilů, případně dalších specializovaných součástí (kolony, extrakční cely, separátory, mísící cívky apod.). Jeho flexibilita umožňuje automatizovat velké množství dějů. Uzavřený systém chrání nejen obsluhu před chemikáliemi, ale i vzorky před vnějším prostředím. Určitou nevýhodou je sériové zpracování vzorku, tedy jeden vzorek po druhém. Zástupci tohoto provedení jsou průtokové metody na principu průtokové injekční analýzy a sekvenční injekční analýzy, ale třeba i kolonová kapalinová chromatografie, která stála u zrodu průtokového uspořádání.

Tato habilitační práce prezentuje vývoj metody sekvenční injekční chromatografie, jednoho z moderních trendů v průtokových metodách. Chromatografie pro průtokové metody znamená velký krok od metod zaměřených na jeden analyt na dnes typickou multikomponentní analýzu. Chromatografie kromě separace na koloně, přináší nové požadavky na zpracování a úpravu vzorku, tlakovou odolnost systému, disperzi v toku, sběr a zpracování dat, a využití metody pro analýzu.

## 2. Cíl práce

Cílem této habilitační práce je popsat hlavní aspekty a diskutovat dosavadní pokroky ve vývoji a využití metody sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Analysis - SIC) v analytické chemii. Tato metoda leží na pomezí mezi průtokovými technikami a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií, které propojuje a rozšiřuje tak možnosti pro automatizaci a miniaturizaci analýzy. Zařazení SIC je ale dané spíše kategorizací analytických metod. Kapalinová chromatografie je v principu průtoková metoda. Stejně tak průtokové metody jsou blízké příbuzné kolonové kapalinové chromatografii, avšak k analytickém stanovení využívají místo chromatografické separace klasické chemické reakce a další fyzikálně chemické procesy.

Metoda sekvenční injekční chromatografie vznikla díky invenci prof. P. Solicha a doc. D. Šatínského v roce 2002 na katedře analytické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy (FaF UK). Originální přístup znamenal zapojení v té době nově dostupné monolitické kolony do jednoduchého systému průtokové injekční analýzy. Vzniklá metoda přinesla do průtokových metod efektivní separaci více látek, věc pro průtokové metody zcela ojedinělou. V tu chvíli bylo jasné, že pro požadavky analýzy bude třeba tento koncept dále rozvíjet.

Bylo štěstím, že jsem byl jedním z prvních, kteří mohli s novou metodou pracovat (v rámci diplomové práce). I díky mému zálibení ve hledání něčeho nového, se metoda sekvenční injekční chromatografie stala nosným tématem mého doktorského studia a dizertační práce, a poté i dalšího vědeckého života včetně habilitační práce. Proto bych rád metodu sekvenční injekční chromatografie prezentoval v teorii i v praxi tak, aby svými vlastnostmi zaujala širší publikum, které by pomohlo jejímu dalšímu rozvoji a uplatnění.

Prezentované odborné práce zařazené do habilitační práce popisují klíčové kroky ve vývoji SIC a její využití pro analýzu. Na ně navazují práce rozšiřující možnosti analýzy a úpravy vzorku v průtokových metodách. Několik prací popisuje vývoj metod HPLC jako standardu z kterého SIC vychází a postupy úpravy vzorku nutné pro chromatografii.



### **3. Teoretická část**

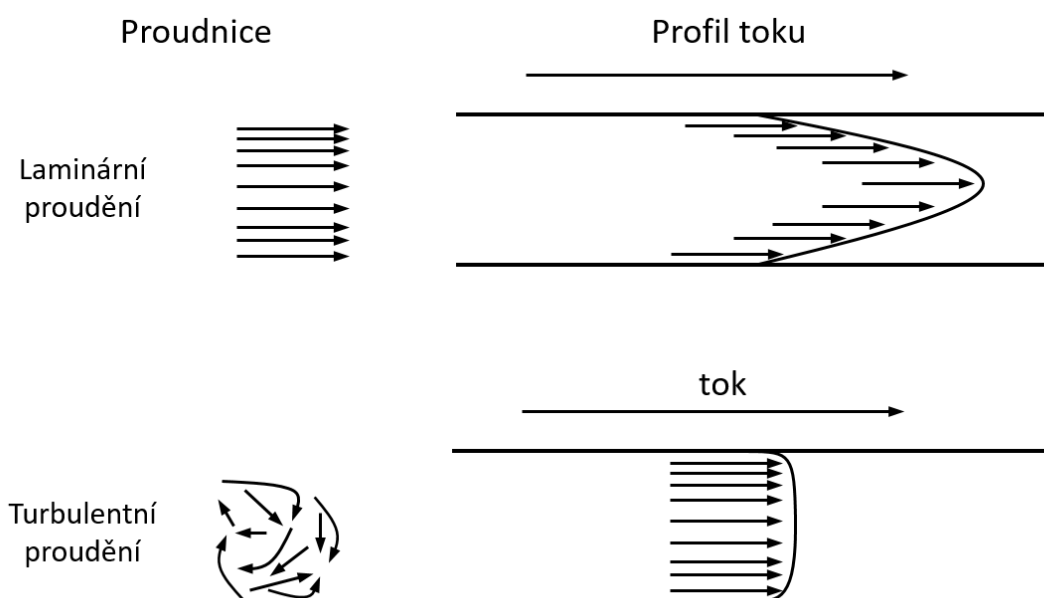
#### **3.1. Úvod do průtokových metod**

##### **3.1.1. Základní vlastnosti průtokových systémů**

Historie průtokových analyzátorů je mnohem starší než rodina metod „Flow Injection Analysis“ založená prof. J. Růžičkou a prof. E. H. Hansenem. Možností uspořádání a funkcí se jedná o otevřenou platformu, jež se dá vymezit několika klíčovými vlastnostmi – použití hadiček/kapilár s vnitřním průměrem menším než 1 mm, tok kapaliny poháněný pumpou, selekce a mísení toku, a pracovní objemy mikro až mililitry. Další vlastnosti, jak se ukázalo během více než 40 let od momentu kdy metoda vznikla, mohou být velmi různorodé. Jedná se zejména o použití pump(y) a ventilů, schéma systému, detekce, sekvence kroků a hodnocení dat. Využití specifických součástí pro specifické účely znamená nové možnosti systémů, což může být ale často na úkor flexibility a univerzality celého systému. Takto by se dala mezi průtokové systémy zařadit drtivá většina automatizovaných analytických metod manipulujících s kapalinami. Vývoj může také vést směrem k nano rozměrům, nebo naopak a ke spojování s mnohem sofistikovanějšími a složitějšími přístroji (HPLC, MS, AAS apod.) [1].

Základní schéma průtokového systému nazvaného Flow Injection Analysis (FIA) bylo vyvinuto prof. J. Růžičkou a prof. E.H. Hansenem v roce 1974 a publikováno v roce 1975 [2]. Autoři definovali základní prvky „průtokového“ konceptu, zejména nástřik vzorku do kontinuálního toku nosného proudu, kontrolovanou disperzi v průtoku a opakovatelné časování jednotlivých kroků. To vše umožnilo výrazně zrychlit celou analýzu včetně snížení spotřeby vzorku a činidel, a také produkci odpadu, zejména v porovnání se starší kontinuální průtokovou analýzou. Zároveň byl opuštěn „batch“ koncept - měření v dávkách v rovnovážném stavu (homogenní smísení vzorku a činidla, a ustálení reakční rovnováhy), tedy vlastnost kopírující standardní (manuální) laboratorní procesy. Toto jsou charakteristiky metody kontinuální průtokové analýzy (CFA) užívající tok kapalin segmentovaný pomocí vzduchových bublin poprvé prezentované L.T. Skeggsem v 50. letech 20. století [3], která byla komercializována firmou Technicon Corp. (USA) a již v 70. letech poměrně rozšířena pro rutinní automatizovanou analýzu. Dnes je CFA stále rozvíjena a široce využívána v rutinních laboratořích pro stanovení širokého spektra klinických parametrů v biologických vzorcích a živin zejména v environmentálních vzorcích [4]. Sekvenční injekční analýza (SIA), jako další generace průtokových metod navazující na FIA, byla zamýšlena tak, aby byla velmi univerzální a dokázala zpracovávat různé metody analýzy jen díky přeprogramování jednotlivých kroků a změně činidel, což je významný rozdíl oproti FIA a jednoúčelovým rutinním analyzátorům [5].

Tok, lépe řečeno proudění, uvnitř kapilár lze rozdělit na dva typy – laminární a turbulentní (Obrázek 1), které mezi sebou za určitých podmínek přecházejí. Kritické parametry pro přechod jsou popsány Reynoldsovými čísly [6]. Průtokové systémy díky rozměrům kapilár, sestavení s přítomností mísících bodů a dalších přechodů, změn průtokových rychlostí a směru toku podporují turbulentní proudění, které je pak efektivně využíváno pro mísení a kontrolovanou disperzi zón jednotlivých kapalin uvnitř toku [7].



Obrázek 1 - Schéma laminárního a turbulentního proudění během průtoku uvnitř kapiláry FIA.

Úroveň disperze určují parametry přístroje (průměr, délka a tvar uspořádání kapilár) a sekvence jednotlivých kroků (směr toku, objem a rychlost pohybu toku uvnitř systému). Parametry přístroje mají na úroveň disperze výraznější vliv. Disperzi uvnitř kapilár lze matematicky popsat. K hodnocení se v nejjednodušší formě využívá disperzní koeficient  $D$ , který je podílem původní koncentrace a koncentrace na konci celého procesu. Nízká disperze ( $1 < D < 3$ ) je vhodná pro přenos vzorku v částech systému mezi místem kde proběhl stanovovaný děj nebo separace a detekční celou. Takto je zamezeno rozmytí zóny např. snižující citlivost a selektivitu chromatografie. Pro podporu průběhu reakcí využívaných pro analýzu se nejčastěji používá střední difuze ( $3 < D < 10$ ), která podporuje efektivní promísení vzorku a činidla, a tím i rychlost analýzy. Vysoká disperze ( $D > 10$ ) se využívá méně často, např. při ředění vzorku nebo činidla. Tyto děje se ale poměrně hůře predikují a kontrolují. I přestože disperzi není možné vždy přesně popsat, vysoká opakovatelnost celého procesu znamená možnost využití v analýze [8].

Je zřejmé, že zoptimalizovat sestavení přístrojů FIA je jednodušší než přístrojů SIA a dalších stále složitějších konceptů přístrojů pro automatizaci více krokových procesů. Opakovatelnost metody, a tedy reprodukovatelnost analýzy, je dána neměnným sestavením přístroje a vysoce

přesným časováním jednotlivých kroků metody. V počátku proto vyhovovala opakovatelnost objemu nástřiku s využitím dávkovací smyčky FIA přístroje při manuálním přepnutí dávkovacího ventilu, ale dnes je standardem plné ovládní přístroje pomocí počítače a přesně časované sekvence příkazů [1, 2]. Vysoká reprodukovatelnost je klíčovou vlastností pro měření v průtokových metodách, v porovnání s manuálním provedením jde o velkou výhodu, ale z dnešního pohledu analytické chemie to je samozřejmá vlastnost prakticky všech přístrojů [9].

Díky kontinuálnímu toku je zajištěno promývání kapiláry zabraňující vzájemnému ovlivnění podmínek po sobě jdoucích měření. Výhodou průtokových systémů je také uzavření celého děje uvnitř systému, tedy omezení vnějších vlivů, možnosti kontaminace a ohrožení operátora. Zejména omezení přístupu vzduchu a světla je zásadní pro některé typy reakcí a detekce (chemiluminiscence). Toto uzavření dějů znamená také zvýšení opakovatelnosti a robustnosti metody, a možnost měřit mimo čisté prostředí laboratoře [10].

Výsledkem procesu v průtoku je signál ve formě píku, jehož výška koresponduje s koncentrací vzorku. Navíc, autoři již od počátku věděli, že získaný signál, popisující měnící se složení toku v čase, dává mnohem více informací o dějích uvnitř systému, které se dají využít pro potřeby analýzy. Bohužel, technologie (zejména způsob záznamu) té doby nedokázala tyto parametry zcela využít [10]. Signál, který vzniká během měření, je ovlivněn zejména přenosem hmoty (proudění a difúze), kinetikou chemické reakce (chemie) a mechanismem snímání vzniklého produktu detektorem, když přenos hmoty je klíčovým prvkem a zároveň rozdílovým prvkem v porovnání s metodami pracujícími v rovnováze [8]. Postupně byly popisovány další možnosti dějů v průtoku využitelné pro titrace, ředění, kalibrace a skenování [11], také byly popsány možnosti využití zastavení toku pro vyšší citlivost detekce nebo kinetické studie dějů [12].

Historicky a z hlediska charakteru analytů byla dříve častější elektrochemická detekce. V době vzniku FIA tento druh detekce dominoval a bylo snadné ho přizpůsobit potřebám průtokových metod zapojením elektrod v průtokové cele. Výhodou byla malá velikost detektoru a snadná dostupnost. Zpracování analogového signálu bylo snadné a snadno zaznamenatele pomocí souřadnicového zapisovače. Také další vlastnosti této detekce – citlivost, selektivita a rychlost odpovědi na změny v průtoku souhlasily s potřebami analýzy té doby.

V případě průtokových metod je dnes převažující optická detekce (UV-vis spektrofotometrie a fluorimetrie). Je oblíbená zejména díky univerzálnosti pro organické sloučeniny, dostatečné citlivosti, snadnému nastavení a vysoké rychlosti sběru dat. Detekci lze optimalizovat pro potřeby měření v široké škále parametrů. Většina vlastností je dnes u těchto detektorů brána za samozřejmost, ale použití optické detekce v průtokových metodách umožnily inovace a miniaturizace na poli zdrojů světla (menší lampy a LED zdroje); vlastních detektorů (přechod na

menší fotonásobiče, diody a diodová pole); nové tvary detekčních cel; a využití optických vláken pro vedení světla. Původní stolní spektrofotometry a fluorimetry vybavené průtokovou celou na místě standardně používané kyvety jsou tak nahrazeny kapesními velikostmi často umožňující integraci do těla průtokového přístroje. To vše nahrává i přenosnosti a použití přístroje mimo laboratoř s napájením pomocí baterií.

Vše i průtokový přístup má také své méně výhodné stránky. Nehomogenní prostředí (gradient koncentrace nebo hustoty) je často při optické detekci zdrojem významného nespecifického signálu díky měnícímu se indexu lomu světla. Je třeba o něm vědět, pracovat s ním a pokud možno eliminovat jeho vliv na signál odpovídající analytu. Lze to buď mechanicky, vhodnou úpravou složení průtoku, tak aby se příliš neměnila hustota jednotlivých zón, nebo tak aby docházelo k plynulejší difúzi zón. Další možnost eliminace je pomocí úpravy programu sekvence, snížení rychlosti nebo vložení pauzy pro uspořádání toku, nebo vhodné korekce zaznamenaných dat. Tento fenomén nazvaný Schlieren efekt lze někdy s výhodou využít pro neselektivní optickou detekci, kdy vzorek má odlišné složení od nosného proudu, a tedy při průchodu detekční celou vykáže signál. Použitelné je to třeba u velmi koncentrovaných vzorků alkoholu nebo cukrů [13]. Paralelu využití děje lze spatřovat např. v teplotně vodivostním detektoru.

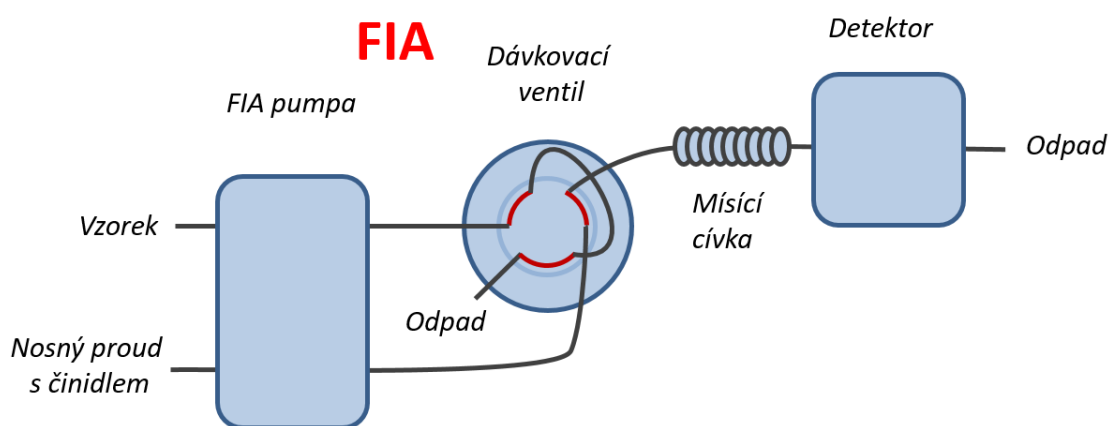
Odezva detektoru je zaznamenávána ve formě dat. Data musí být vhodně interpretována, aby dala analytickou odpověď. Vývoj detektorů šel od analogových, umožňujících v čase zaznamenávat jen jeden kanál se signálem, k digitálním, které umožňují záznam více kanálů nebo dokonce celého spektra. Základní forma dat je v uspořádání  $xy_1, xy_2, \dots, xy_z$ , tedy záznam několika kanálů v čase. Takto získáváme mnoho informací během analýzy, ale musíme umět s těmito daty správně pracovat a správně je vyhodnotit.

Až 40 let po uvedení FIA, prof. J. Růžička zrevidoval možnosti celého konceptu a popsal celé spektrum reálného využití programovatelného toku v analýze, když jako klíčové prvky definoval pochopení fyzikálních dějů, pokroky v přístrojové technologii a informační technologii (řízení přístroje počítačem a zpracování dat) [14]. Výsledkem je ještě vyšší citlivost a rychlost měření dosahující i stovek analýz za hodinu, a tím efektivnější využití průtokových metod pro analýzu [15].

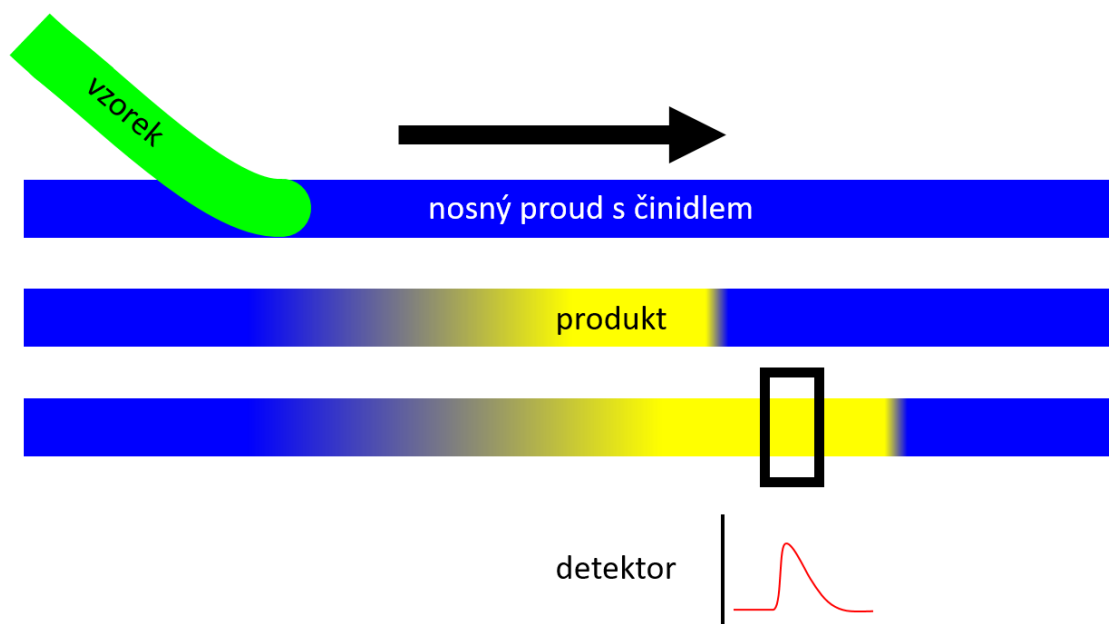
Prof. Hansen charakterizoval potenciál průtokových metod takto: „Nejlepší test pro analytický postup není to, že dokáže dělat věci lépe, než dokážou ostatní postupy, ale že nám umožní provádět něco, co nelze provést jiným způsobem“ [16]. Bohužel se dá říci, že i tak zůstává část potenciálu průtokových metod dnes nevyužita, když většina metod a konceptů průtokových metod „jen“ automatizuje procesy v rovnováze, které mají svou manuální předlohu [17].

### Průtoková injekční analýza

Průtoková injekční analýza (FIA), první generace průtokových metod, je tvořena kontinuální pumpou a přepínacím dávkovacím ventilem, který má dvě polohy a přepíná nejčastěji mezi šesti nebo osmi kanály. Schéma FIA zobrazuje *Obrázek 2*. FIA využívá kontinuální tok uvnitř kapilár o vnitřním průměru 0,5 – 1,5 mm a ve své nejjednodušší formě je zóna vzorku nastříknuta pomocí dávkovacího ventilu do toku nosného proudu obsahující činidlo vstupující do reakce se vzorkem [2]. Jak se zóna vzorku pohybuje v kapiláře systémem, dochází k disperzi (gradientovému rozptýlení/mísení v nosném proudu) a tím je podpořena reakce vzorku s činidlem. Zóna obsahující produkt reakce v koncentračním gradientu je poté dále unášena tokem až do průtokové cely detektoru. Schéma gradientového mísení ve FIA zobrazuje *Obrázek 3*.



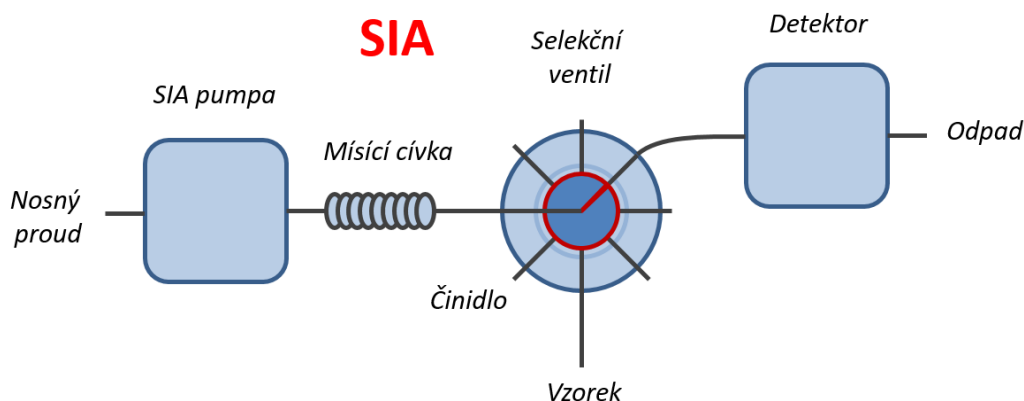
*Obrázek 2 – Schéma systému průtokové injekční analýzy.*



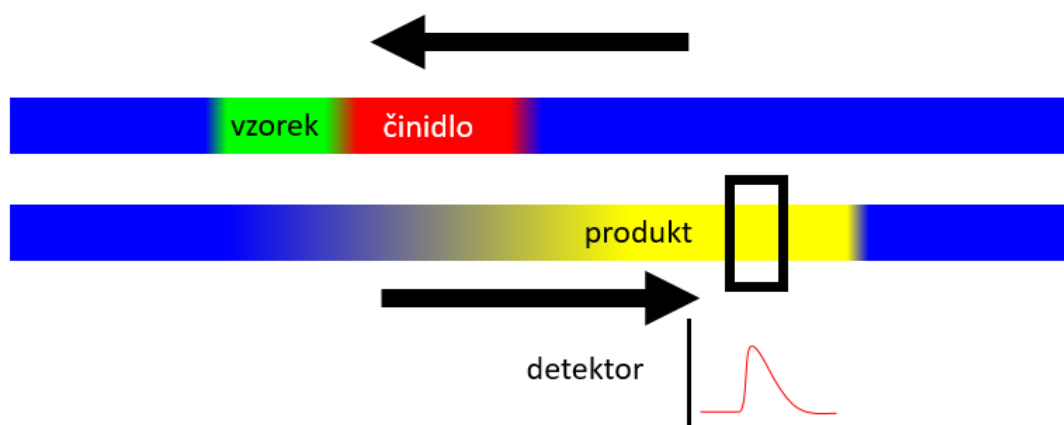
*Obrázek 3 - Schéma mísení v toku a reakce v systému průtokové injekční analýzy.*

### Sekvenční injekční analýza

Metoda sekvenční injekční analýza (SIA), je tvořena obousměrnou pístovou pumpou a selekčním ventilem, který přepíná mezi jednotlivými kanály. Schéma systému SIA zobrazuje *Obrázek 4*. SIA využívá odlišný postup pro tvorbu gradientového rozptýlení zón vzorku a činidla v toku. Sekvence příkazů ovládající selekční ventil a obousměrnou pumpu tvoří uvnitř kapiláry sekvenci zón vzorku a činidla. V prvním kroku dojde k postupnému nasátí jednotlivých zón do mísící cívky tvořené dlouhou stočenou kapilárou (tok směrem k pumpě) a v druhém kroku k vytlačení celé sekvence vzájemně smíšených zón do průtokové cely detektoru (tok směrem k selekčnímu ventilu) [5]. Gradientové mísení v SIA zobrazuje *Obrázek 5*.



*Obrázek 4 – Schéma systému sekvenční injekční analýzy.*



*Obrázek 5 - Schéma mísení sekvence zón v systému SIA.*

### 3.1.2. Programování toku v průtokových metodách

Pro průtokové metody jsou klíčové děje probíhající v toku. Cílem vývoje metody je sestavit přístroj a nastavit podmínky tak, abychom dosáhli požadovaných úkonů: mísení, inkubace reakce,

oddělení složek, různé stupně disperze, efektivní detekce atd. [1]. Kontinuální neměnná průtoková rychlost je relativně neefektivní pro mísení, separace, inkubace reakcí a monitorování dějů, protože tyto operace vyžadují poměrně odlišné časové rámce pro efektivní provedení. Většina analýz se skládá z několika odlišných kroků. Pro vysokou efektivitu každého kroku je vhodné použít vhodnou průtokovou rychlost a objem jednotlivých zón. Docílíme tak potřebnou citlivost a rychlost analýzy, a zároveň nízkou spotřebu roztoků a související produkci odpadu. Snadno programovatelné pumpy používané v SIA umí pracovat v širokém rozsahu průtokových rychlostí a objemů. Lze tedy použít vysoké rychlosti pro zefektivnění mísení vzorku s činidlem nebo promytí systému, nízké rychlosti (případně zastavení toku) pro delší čas inkubace produktu reakce, a střední rychlosti pro přenos produktu reakce do detektoru [14].

Obousměrný tok, další použitá pumpa, upravený selekční ventil (např. Lab-On-Valve), použití průtokových cel detektoru s dlouhou optickou dráhou (5-40 cm) a další specializované součásti přináší další ještě mnohem širší variabilitu v programování průtoku. Opět je cílem zefektivnění celé analýzy – ve smyslu zkrácení času analýzy, vysoké citlivosti a selektivity analýzy, ale i v provedení takových kroků, které přináší zcela nové možnosti využití průtokových metod pro dvoustupňové a vícestupňové analýzy [15]. Navíc, vhodně nastavená kombinace jednotlivých kroků, podmínek měření a nastavení detekce, dokáže v průtoku vytvořit virtuální homogenní prostředí a rovnovážný stav. Tím se dále rozšiřují možnosti průtokových metod nejen pro zvýšení citlivosti měření [18].

### **3.1.3. Miniaturizace a automatizace**

Miniaturizace je jednou z cest k omezení dopadu chemie na životní prostředí, shrnuté v pravidlech „zelené chemie“, které se staly trendem již v 80. letech 20. století. Miniaturizace znamená snížení spotřeby vzorků a činidel, a tím také snížení produkce odpadu. Průtokové metody tento trend následovaly a stále následují. Vývoj směřoval od manuálního nástřiku k ovládání celého systému pomocí počítače. Efektivnější sběr a práce s daty zvýšily přesnost a rychlost průtokových metod. To umožnilo v roce 1990 vznik metody sekvenční injekční analýzy (SIA). Tato metoda, spočívající ve tvorbě sekvence zón vzorku a činidel, přináší větší univerzálnost přístroje a efektivnější práci se vzorky a činidly (spotřebuje se jen tolik kolik je potřeba pro vlastní měření) [5, 19]. Další miniaturizace inspirovaná formátem analytických metod Lab-On-a-Chip [20] dala v roce 2000 vzniknout metodě Lab-On-Valve [21], která si stále zachovává všechny původní vlastnosti metody SIA, navíc se stala vhodným nástrojem pro Bead Injection (BI) analýzu, využívající interakce toku s tuhým materiálem, konkrétně využívající mikrokolon s automatizovanou obnovou sorbentu [22]. Vývoj dalších forem průtokových metod na sebe nenechal příliš čekat. Většinou každá pracovní skupina, díky dominanci „home made“ přístrojů, využívala charakteristickou sestavu a postup, které si pak specificky pojmenovala [23].

Např. multicommutated flow injection analysis (MCFIA), multisyringe flow injection analysis (MSFIA), multipump flow injection analysis (MPFIA) and all injection analysis (AIA) [17]. Přesto se dá říci, že jde prakticky jen o obměny využívající různé modifikace systémů, ale již známé principy. Metoda FIA se navíc již v 80. letech stala inspirací pro další metody  $\mu$ TAS/Lab-On-Chip [20], dnes velmi populární. Ironií je, že jejím principem je práce v rovnovážném stavu a jednocelovost.

Automatizaci analýzy využívající principy průtokových metod popsal ve své publikaci prof. Růžička v roce 2000 „přechod od kádinky do průtoku“, kde zdůraznil, že už na počátku si přál technologický pokrok v počítačové technice a dostupnost dílů umožňující další rozvoj průtokových metod. Rozvoj průtokových metod byl za prvních 25 let značný, ale určitě ještě nebyl u konce, což se potvrdilo během dalších 15 let [14]. Ani rok 2018 se díky nezměrné aktivitě zejména prof. Růžičky naštěstí nestává konečnou fází vývoje [15]. Zde se ukázala jako důležitý prvek těsná spolupráce s výrobcí průtokových systémů, jejichž klíčoví vývojáři jsou bývalí studenti prof. Růžičky (firmy FIAlab Instrumentals a Global FIA).

#### **3.1.4. Rychlost analýzy a rychlost zpracování vzorků**

Průtokové metody jsou díky svým vlastnostem často charakterizovány vysokou rychlostí zpracování vzorků. V nejjednodušším uspořádání jde o sériové měření, jehož rychlost je dána zejména dějem, který je využit k analýze. Využití kinetiky a dynamiky dějů, kdy není třeba dosáhnout chemické rovnováhy, vede ve výsledku k výrazně kratší době nutné pro analýzu, než je potřeba při manuálním provedení, které využívá chemickou rovnováhu. Nejrychlejší jsou metody využívající rychlé jednostupňové reakce. Využití více reakčních kroků je již výrazně pomalejší. Pomalejší kroky jsou i kroky založené na extrakci. Při homogenní LLE je klíčový čas nutný pro oddělení nemísitelných fází. Při dynamickém provedení LLE čas narůstá nutným použitím více kroků a nižších průtokových rychlostí zajišťujících efektivitu extrakce. Určující je i objem extrahovaného vzorku. Pokud chceme docílit zakoncentrování analytů, tak dávkování většího objemu vzorku tvoří významnou část času celé extrakce. V případě SPE také nelze očekávat vysokou rychlost zpracování. Objem vzorku pro SPE je zpravidla větší (až mililitry) a zároveň zpětný tlak kolony a efektivita extrakce vyžadují použití relativně nízkých průtokových rychlostí při dávkování vzorku. Chromatografie je celkovou rychlostí blízká SPE. Použitelné průtoky díky relativně vysokému zpětnému tlaku jsou ještě nižší, naopak malý objem nástřiku vzorku čas analýzy významně neprodlužuje. Reálná rychlost průtokových metod obvykle není tak vysoká jako v uváděných příkladech. Vícekrokové analýzy budou vždy pomalejší a v případě extrakce a chromatografie je to charakteristická vlastnost.



Jisté zrychlení může přinést paralelní uspořádání nebo zpracování více vzorků v různých krocích metody zároveň. Takovýto přínos je ale relativizován velkou složitostí celého přístroje, a vývoje metody a provedení analýzy, což se odráží v nižší celkové robustnosti metody.

Pokud hodnotíme metodu ne podle její absolutní rychlosti, ale podle hodnoty analytické informace, je sice rychlá metoda využívající jednoduchou reakci pro stanovení jednoho analytu zajímavá, ale chromatografie umožňující separaci více analytů ve vzorku, i když mnohem pomalejší, přináší mnohem komplexnější analytickou informaci o vzorku. Tento trend v současné analýze je naprosto zřejmý.

### 3.1.5. Selektivita průtokových metod

Tak jak se vyvíjela analytická chemie, vyvíjely se i její požadavky na selektivitu. Pokud průtoková metoda vznikla převedením klasické metody analýzy do průtoku, byla pak odpovídající i její selektivita. Vyvíjené metody byly dlouhou dobu cíleny na analýzu jedné konkrétní látky a jen v ojedinělých případech na analýzu logických analytických párů např. redoxní pár  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}_3^-$ . Moderní analýza má ale mnohem větší požadavky na selektivitu, očekává analýzu složitějších vzorků a vysokou selektivitu pro velmi podobné analyty. Základní instrumentace využívající chemickou reakci a jednoduchou detekci pro tyto požadavky nemusí stačit. Stále častěji jsou tak využívány vícekanálové optické a další spektrální detektory. Využití extrakce nebo separace ale otevírá zcela nové možnosti v selektivě průtokových metod [23].

Chemometrie je jedna z dalších cest, jak zvýšit selektivitu a docílit multikomponentní analýzy. Jednoduchý a zajímavý příklad je generalizovaná kalibrační strategie pracující se systematicky plánovaným systémem kalibrace a proměřením různých poměrů vzorku se standardními přídávky [24] nebo využití celého absorpčního spektra snímaného detektorem a následné matematické sekundární zpracování naměřených dat [25].

### 3.1.6. Typické úkoly průtokových metod

Analytické procesy se dají rozdělit do tří kroků – odběr vzorku, úprava vzorku a vlastní měření. Průtokové metody se dají využít ve všech zmíněných oblastech.

Jako příklad automatizace odběru vzorku pomocí průtokových metod lze jmenovat disoluční testy tuhých léčivých přípravků (tablety, kapsle, masti) [26], nebo pravidelné odebírání vzorků z dlouhodobých procesů při průmyslové nebo biotechnologické výrobě nebo v přírodě [27]. K disolucím je třeba použít speciální reaktory nebo cely, ze kterých je pak disoluční rozpouštědlo s analytem odebíráno pomocí průtokové metody. Pro farmaceutické přípravky jsou využívány předepsané disoluční/liberační cely a jednodušší spektrofotometrická nebo fluorimetrická detekce dle požadavků lékopisu [28]. Pro monitorování více látek je využíváno spojení disoluce se separací v SIC [29]. Průtokové metody lze využít i k automatizaci monitorování mineralizačních

nebo rozkladných dějů při elementární analýze (dusík, fosfor,...) ale i pro stanovení proteinů v proteomice [30]. Příkladem analýzy tuhých vzorků může být kontinuální extrahování anorganických iontů z geologických (horniny) a environmentálních (půda) vzorků a jejich následná analýza pomocí AAS nebo dalších spektrálních metod [31].

Při úpravě vzorku je nejčastějším cílem extrakce a prekoncentrace analytů ze vzorku a odstranění interferující matrice pro zvýšení selektivity analýzy a zakoncentrování cílového analytu pro zvýšení citlivosti analýzy. Formátů a podmínek extrakcí je (stejně jako v případě manuálního provedení) nepřehledné množství. Dnes se jedná o dominantní využití průtokových metod na úkor metod využívajících chemické reakce. Využívány jsou extrakce na tuhou fázi [32], separace využívající selektivní membránu [33], separace mezi plynem a kapalinou [34] a extrakce z kapaliny do kapaliny [35]. Extrakce na tuhou fázi je často spojována s kapalinovou chromatografií [36].

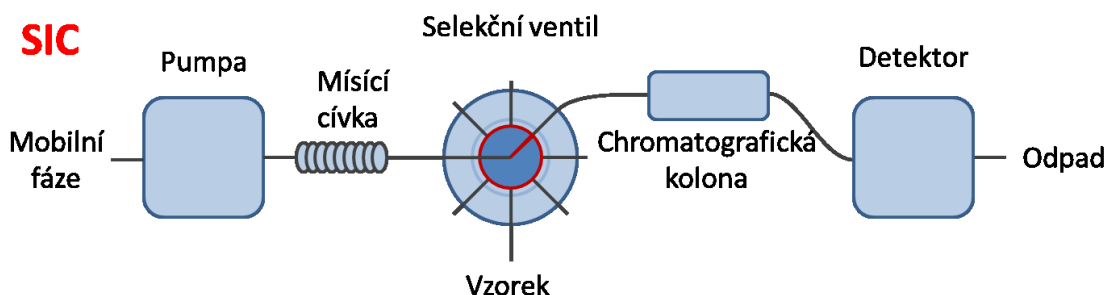
Škála aplikací průtokových metod je velmi široká, od stanovení anorganických kationtů v mořské vodě [37] až po stanovení velkých biomolekul v biologických vzorcích [38]. Jmenovat lze automatizace měření velkého množství vzorků v laboratoři [39] i mimo laboratoř [40]. Nástroje pro výzkum fyzikálních parametrů a chemických dějů [7]. Metody pro analýzu v oceánografii, v biochemii, v biotechnologii, ve farmacii, v životním prostředí, v zemědělství, v chemické syntéze, potravinářskou analýzu, kinetické studie atd. [41]. Dále průtokové metody slouží k automatizaci měření na stolních analyzátoch – spektrofotometrie, luminiscence, atomová spektroskopie, vibrační spektroskopie, elektrochemie, hmotnostní spektrometrie, indukčně vázaná plazma spojená s atomovou emisní spektrometrií apod. [42]. Navíc, spojením s dalšími analytickými technikami, kapilární elektroforézou, HPLC, GC, vznikají vícedimenzionální metody [43].

### 3.2. Sekvenční injekční chromatografie

Metoda SIC vznikla zapojením monolitické chromatografické kolony do systému SIA [44]. Pro první práce byla kolona zapojena do standardního SIA systému (Obrázek 6), ale bylo zřejmé, že pro chromatografii budou třeba jeho různé úpravy. Základní sestavení SIC obsahuje jednu pumpu a jeden vícecestný ventil (Obrázek 7), ale pro řešení složitějších úkonů lze rozšířit sestavu přístroje o další ventily, případně pumpy. V případě podobné metody multisyringe chromatography (MSC), která vznikla zapojením monolitické kolony do průtokové metody multisyringe flow injection analysis, se využívají tyto pumpy 2-3. Tím je teoreticky umožněno i přímé mísení složek mobilní fáze, z praktického hlediska tato varianta trpí vznikem bublin vzduchu při mísení díky nepřítomnosti odplynovače [45].



Obrázek 6 - Detail prvního systému SIC na bázi standardního přístroje SIA.



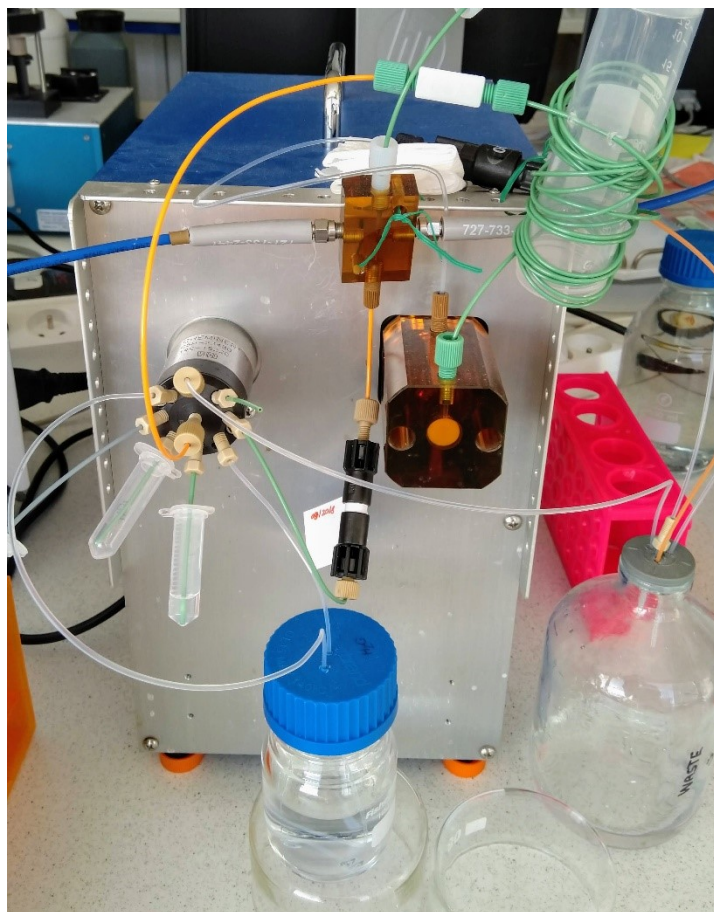
Obrázek 7 - Schéma zapojení systému sekvenční injekční chromatografie.

V následujících kapitolách budou probrány vlastnosti jednotlivých částí SIC i celkové aspekty použití metody.

### 3.2.1. Pumpy

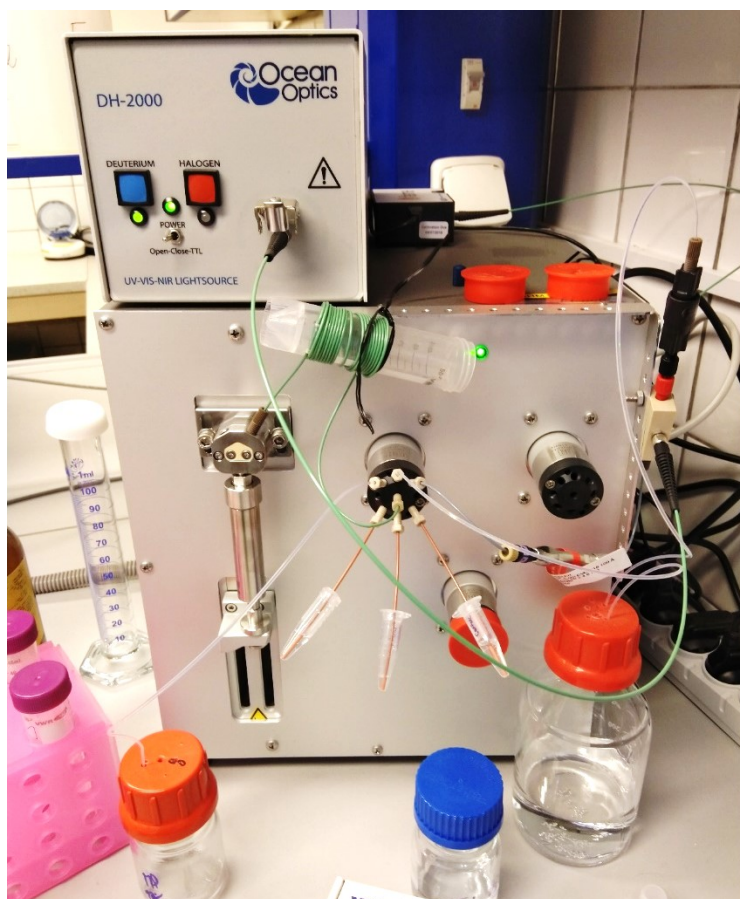
Pokud budeme považovat za SIC pouze takový systém, který vychází ze SIA, je pro SIC typická pístová pumpa umožňující pohybovat tokem oběma směry. Chromatografie ale přinesla do průtokových fenomén výrazně vyššího zpětného tlaku, který musí pumpa překonat. Standardem SIA je pumpa se skleněnou stříkačkou s objemem 1-10 ml a pístem z nerezové slitiny vybaveným chemicky inertním pístním kroužkem. Jde o laboratorně často užívané pumpy značek Cavro, Kloen, nebo Crison, ovládané přesným krokovým motorem s hlavou vybavenou přepínacím ventilem se dvěma nebo třemi vstupy. Tato pumpa dokáže pracovat v rozsahu průtokových rychlostí 0,06-10 ml min<sup>-1</sup> s vysokou přesností dávkovaného objemu a tlakem až 250 psi (≈17 bar / 1,7 MPa) [44]. Sklo jako materiál stříkačky je zřejmou nevýhodou, protože jeho nižší pevnost v tahu a křehkost může vézt k netěsnostem nebo dokonce zničení stříkačky při vyšších průtokových rychlostech a pracovních tlacích. Dalším slabým místem je hlava pumpy s dvoucestným nebo třicestným ventilem. Ventil v běžné konfiguraci obsahuje jednoduchou tlakovou pojistku určující maximální pracovní tlak pumpy, který ale postupným opotřebením při práci blízko tlakového limitu postupně klesá. Přejít na pístovou pumpu s vyšší tlakovou odolností se ukázalo jako důležitý krok rozvoje SIC, ale také jako nejtěžší. Najít takovou pumpu na trhu a integrovat ji do systému trvalo několik let.

Díky zřejmé potřebě práce za vyšších pracovních tlaků byl vyvinut ve spolupráci výzkumné skupiny průtokových metod na katedře analytické chemie FaF UK a firmy FIAlab Instrumentals (USA) přístroj nazvaný SICrom™ (*Obrázek 8*), který používá jako hlavní inovaci pístovou pumpu Sapphire (IDEX) s tělem z chemicky a mechanicky odolného polymeru Ultem® a pístem ze safíru. Tato pumpa dokáže dlouhodobě pracovat za dvojnásobných tlaků než skleněná pístová pumpa (500 psi ≈35 bar / 3,5 MPa s možností zvýšení až na 1000 psi ≈70 bar / 7,0 MPa), nepoužívá hlavu s přepínacím ventilem a celkově je i mechanicky robustnější. Pro SIC to byl pokrok, znamenající možnost použití delších monolitických a částicových kolon, ale i tak šlo z pohledu tlakové odolnosti o nejslabší článek celého systému, limitující další rozvoj [46].



Obrázek 8 - Systém SICrom™, FIALab Instrumentals.

Dlouhou dobu se nedařilo najít vhodnější řešení a tím i dále posunout možnosti SIC, až další úspěšná spolupráce skupiny průtokových metod na katedře analytické chemie FaF UK s firmou FIALab Instrumentals přinesla v roce 2018 druhou generaci přístroje SIC využívající pumpu neMESYS 1000N (Cetoni, Německo) s tělem z nerezové oceli umožňující práci až při 3000 psi ( $\approx 200$  bar / 20 MPa) (Obrázek 9). Toto je velmi významný pokrok směrem k použití moderních částicových a delších monolitických kolon, které znamenají větší variabilitu a vyšší separační účinnost. Objem stříkačky je 5 ml s možností výměny za 10 ml stříkačku, tedy i tento parametr je stále relativně limitující. Naštěstí vzhledem k typicky používaným kolonám je její objem pro jednotlivou separaci dostatečný (pumpa je naplněna před každou separací).



Obrázek 9 – Systém SICrom™ II využívající nový typ pumpy neMESYS 1000N.

Pro SIC je možno použít i další dostupné pumpy, ale ani v jednom případě nejsou zřejmým přínosem, tedy dostatečně stabilní při práci za tlaků typických pro kapalinovou chromatografii. Velice perspektivní variantou pumpy pro průtokové metody je milliGAT™ (GlobalFIA, USA) (Obrázek 10). Je to kontinuální pumpa využívající čtveřici synchronizovaných safírových pístů v robustním těle ze slitiny kovu umožňující práci v široké škále průtokových rychlostí  $nl\ min^{-1}$  až  $10\ ml\ min^{-1}$  s vysokou přesností objemu. Bohužel tyto pumpy zatím nedokáží pracovat za tlaků vyšších než 200 psi ( $\approx 14\ bar / 1,4\ MPa$ ), ale jejich vývoj díky výrobci stále pokračuje. Zatím se tak uplatňují zejména při on-line SPE. Na testování nových milliGAT™ pump pro výrobce GlobalFIA se podílí také naše pracovní skupina.



Obrázek 10 - Pumpa milliGAT™ typická pro přístroje firmy Global FIA.

Peristaltická pumpa typická pro FIA je sice kontinuální, tedy pracuje bez nutnosti kroku nasátí mobilní fáze před separací, ale má výrazné tlakové omezení, pulzující tok a vyžaduje častou výměnu peristaltických hadiček. Přesto některé skupiny rozšířili možnosti FIA o chromatografický krok s použitím 5 nebo 10 mm monolitické kolony pro velmi jednoduché separace 2-3 analytů [47].

### 3.2.2. Ventily

Rozcestníkem toku v průtokových metodách je ventil. Jeho úloha je dávkování vzorku a další potřebné změny kanálů pro vzorek, činidla, mobilní fáze, detektor, odpad atd. Pro SIA a SIC je typický selekční ventil, přepínající mezi centrálním vstupem napojeným na pumpu a bočními vstupy (vzorek, činidla, mobilní fáze, detektor a odpad). V případě přístroje SICrom™, používajícího pumpu bez přepínacího ventilu, slouží selekční ventil i pro potřeby naplnění pumpy mobilní fází. Pro pokročilejší varianty SIC, kdy zapojíme do automatizovaného procesu i úpravu vzorku (SPE nebo LLE) využíváme druhý selekční nebo přepínací ventil [48, 49].

Vícecestný selekční ventil s hlavou z chemicky odolného polymeru, běžně používaný v průtokových systémech, má tlakovou odolnost do 500 psi ( $\approx 35$  bar / 3,5 MPa), když opět postupně při opotřebování tlaková odolnost klesá. SICrom™ byl z výroby vybaven ventilem s nastavcem LOV pro možnosti detekce a extrakce v uspořádání Bead Injection, ale ten se neukázal vhodný pro separace, jeho tlaková odolnost dosahuje stejných nebo spíše nižších hodnot než

standardní ventil, a navíc jeho kanály jsou širší, tedy i vnitřní mrtvý objem a disperze jsou vyšší. Jeho využití je tedy možné jako sekundární ventil mimo vysokotlakou chromatografickou část. Došlo tedy k výměně hlavy ventilu za variantu pro HPLC (z nerez oceli nebo polymeru) s vyšší tlakovou odolností do 5000 psi ( $\approx 350$  bar / 35 MPa) a delší životností. Výhodou této varianty je i výrazně menší vnitřní (mrtvý) objem uvnitř hlavy i ve spojích mezi ventilem a kapilárou.

### 3.2.3. Detekce

Dnes standardním detektorem v průtokových metodách je spektrofotometr využívající průtokovou detekční celou. Původní řešení pro FIA/SIA nebo v případě LOV používá jednodušší sestavení průtokové cely s optickými kabely bez konektorů, jen s holými konci optických vláken utěsněnými v kabelu pomocí pryskyřice. Toto řešení není pro dlouhodobé použití s organickými rozpouštědly vhodné díky nízké chemické odolnosti pryskyřice i vlastního křemenného optického vlákna, které postupně ztrácí potřebné optické vlastnosti. Pro potřeby SIC byla nutná nastavení a úpravy co nejvíce odpovídající zkušenostem z HPLC. Detekční cela s tvarem Z s optickou délkou 10 nebo 20 mm je vyrobená z chemicky odolného materiálu (PEEK, Ultem<sup>®</sup>, PTFE apod.) s vnitřním průměrem kanálku 0,75 mm (opět pro minimalizaci vnitřního objemu), s křemennými okénky pro přenos světla pomocí optických vláken o průměru 0,6 mm, zakončených konektory. Cela je tak kompletně chemicky odolná. Použitím kapilár o vnitřním průměru 0,25 mm mezi kolonou a detekční celou byla minimalizována disperze a mrtvý objem.

Nastavení parametrů detektoru je velmi důležité. Vzhledem k široké škále možností sestavy zdroj záření, detekční cela a detektor. V případě spektrofotometrie je třeba nastavit vhodné parametry pro vlnové délky (ideálně specifické pro detekované látky), ale i nespecifické pro korekci signálu nebo záznam celého spektra pro pomoc při optimalizaci metody; integrační čas tak aby nedocházelo k přesycení detektoru světlem a zpomalení sběru dat, nebo naopak nedostatečnému rozlišení signálu od šumu detektoru; frekvenci sběru dat v rozmezí 4-10 Hz (pro dostatečně plynulý záznam zachovávající minimální potřebné množství bodů na pík, když více bodů znamená lepší následné zpracování záznamu; a počet datových bodů tvořící jeden bod záznamu (často 2-5, pro primární omezení nespecifického šumu). Vzhledem k relativně nízké rychlosti sběru dat u nejběžnějších detektorů připojených k počítači přes USB, jde spíše jen o 1-3 body záznamu za sekundu, což je blízko hranice pro použití v rychlých separacích.

Použití dalších druhů detektorů typických pro kapalinovou chromatografii je možné, ale zde často narážíme na nepříliš výhodný poměr mezi výhodami, a cenou, velikostí a možností plné integrace do průtokového systému. Přesto HPLC spektrofluorimetr přináší rozšířenou citlivost a selektivitu [49]. Hmotnostní detekce jako dnes „ideální“ detektor naráží na potřebu vakua, dusíku a stabilní teploty. Ovšem informace získané analýzou pak mají nesrovnatelně větší hodnotu. Spojení SIC s hmotnostní detekcí je také jeden z cílů vývoje. Vznikla by tak rychlá



extrakční/separační metoda pro jednoduchou úpravu vzorku před vysoce selektivní a citlivou detekcí.

### 3.2.4. Záznam a zpracování dat

Chromatografická data se zaznamenávají, stejně jako v SIA, jako závislost odezvy detektoru (absorbance) v čase. Hned v prvním kroku zpracování lze uplatnit vyhlazení (odstranění šumu) pomocí vhodných algoritmů (např. Savitzky-Golay nebo klouzavý průměr). Poté už můžeme nahlížet na data jako na chromatografický záznam a pracovat s nimi jako se souborem píků. V tuto chvíli přestává software standardně dodávaný s průtokovými analyzátoři stačit. Dnes běžné hodnocení záznamu v SIA je založeno na nastavení časového okna nulové linie a nastavení časového okna, kde je očekávaný signál (pík) analytu. Za vrchol píku je pak brána maximální hodnota v daném okně. Tato forma kvantitativního hodnocení je i vzhledem k ostatním vlastnostem SIC separace dostatečná, byť odečet plochy pod píkem je dnes standardem. Problémem je to, že software takto vyhodnotí automaticky jen jeden pík, tedy jednu látku v jednom záznamu. To ovšem není případ chromatografie. Je sice možné zadat více menších oken pro sběr dat, ale není to univerzální řešení. Pokud dojde ke změně retenčních časů jednotlivých píků (například během vývoje metody), tak jsou výsledky nesprávné. Vliv na správné hodnocení může mít i drift základní linie nebo různá velikost píků, kdy za pík může být vyhodnocen i nespecifický signál prostředí.

Chromatografický záznam je třeba hodnotit matematicky. K tomu slouží řada parametrů (pro chromatografii naprosto samozřejmých). Vychází z hodnocení píků a celé separace. Pro hodnocení tedy potřebujeme retenční čas píku, výšku píku, plochu pod píkem, ale také šířku píku v 5% výšky, šířku píku v 50% jeho výšky, šířku vzestupné části píku v 5% jeho výšky, retenční čas mrtvého objemu, rozpětí šumu pozadí na chromatogramu získaného při slepé zkoušce a některé další. Z nich pak můžeme vypočítat parametry separace – faktor symetrie, účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater, kapacitu píku, rozlišení píků, poměr signálu k šumu a opakovatelnost retenčních času a odezvy detektoru. Hodnoty pak porovnááme s kritickými hodnotami jednotlivých parametrů, nebo během vývoje mezi jednotlivými podmínkami separace. Nejnovější software SICrom™ učinil ve zpracování dat velké pokroky, nicméně stále nedosahuje možností HPLC ve zpracování chromatografických záznamů a vyhodnocování chromatografických dat. Pro přesnější vyhodnocení chromatogramu je lepší použít jiný software např. MS Excel nebo OpenCHROM. Hodnocení a validace celé separační metody je třeba provádět také s použitím externího software např. MS Excel. Celkově, sběr a vyhodnocování dat nejsou v software ovládající SIC dostatečné a sekundární použití externích programů je uživatelsky náročnější než standard HPLC.

### 3.2.5. Chromatografické kolony

Kolona je klíčovým prvkem chromatografie. Je zřejmé, že podobné separace, které lze provést v SIC, jsou v HPLC jednoduše dosažitelné, ale tato instrumentace je nepoměrně složitější, náročnější na ovládání a finančně náročnější. Zatímco metoda SIC díky monolitickým kolonám vznikla, pro HPLC jsou monolitické kolony jen jedním z trendů rychlé chromatografie, definovaných na přelomu tisíciletí [50].

Klíčovým limitem chromatografie, nejen v průtokových metodách, je odpor sorbentu vůči průtoku mobilní fáze vytvářející tlak uvnitř systému, který musí překonat pumpa pro pohyb mobilní fáze. Monolitické kolony, díky své relativně vysoké porozitě, nekladou zdaleka tak velký odpor toku mobilní fáze v porovnání s částicovými kolonami, a lze je tedy efektivně používat i v průtokových systémech generující nižší tlaky než standardní HPLC. Monolitický sorbent tvořený silikagelem má jasný pracovní rozsah pH 2,0-7,5 a odolnost vůči vysokým pracovním tlakům (je to dáno i obalem z polymeru PEEK a použitými ferulemi). Větší délky kolon s větším vnitřním objemem (1-2 ml) hůře korespondují s omezeným objemem pístové pumpy v SIC (5-10 ml). Přímá úměra mezi průtokovou rychlostí a zpětným tlakem také definuje použitelné průtokové rychlosti, přesto pro velmi krátké kolony (5-10 mm) lze použít až  $3,0 \text{ ml min}^{-1}$  [51]. Výsledkem mohou být i poměrně rychlé separace v čase v jednotkách minut. Bohužel další vývoj komerčně dostupných monolitů se až do letošního roku neuskutečnil, a i metoda SIC jako taková se nedokázala díky minimálnímu komerčnímu vývoji/úspěchu rozvíjet směrem k dokonalejšímu separačnímu nástroji, plně využívajícím vlastností monolitických kolon.

Pro potřeby SIC se hledá alternativa k monolitům poněkud obtížně. Přesto krátké kolony s povrchově porézními částicemi, uvedené výrobci v posledních letech, mohou dále rozvíjet možnosti separace v SIC. Tyto kolony vykazují zpětný tlak, který při použití délek 20-50 mm a průtoku do  $1,0 \text{ ml min}^{-1}$ , vyhovuje limitům SIC. Velkou výhodou je rozmanitost velikostí, typů sorbentů a vyšší separační účinnost. Při srovnání C18 monolitické kolony (100×4,6 mm) s C18 kolonou (30×4,6 mm) s povrchově porézními částicemi (2,7  $\mu\text{m}$ ) se teoretické předpoklady vyplnily. Částicová kolona vykazovala tlak odpovídající SIC, vyšší separační účinnost a nižší vnitřní objem [46].

Pro separaci v SIC byla už použita docela široká škála kolon: silikagelové monolitické o délkách 5, 10, 25, 50 a 100 s průměry 2, 3 a 4,6 mm, v modifikacích C18, CN, NH<sub>2</sub> a diol; a kolony s povrchově porézními částicemi o délkách 30 a 50 mm s průměry 3 a 4,6 mm, v modifikacích C18, RP-Amid, Phenyl-Hexyl, PFP a HILIC.

### 3.2.6. Dávkování vzorku a vzorky

FIA a SIA jsou poměrně otevřené metody k formě a objemu dávkovaného vzorku. Dávkování vzorku v SIC má naopak mnohem blíže k HPLC než k průtokovým metodám. Běžně dávkované objemy jsou 10  $\mu\text{l}$  až desítky  $\mu\text{l}$ . Zároveň je třeba počítat s tím, že větší objemy vzorku lze bez ztráty separační účinnosti nadávkovat jen v případě složení rozpouštědla slabší eluční síly než má mobilní fáze [52]. Právě nevhodné dávkování vzorku o objemu běžném pro FIA/SIA (stovky  $\mu\text{l}$ ) často vedlo k vzniku SIC metod s velmi omezenou separační účinností. V SIC se dávkuje vzorek na kolonu po předchozím nasátí do mísící cívky, když takto lze snadno měnit objem nástřiku. SIC dokáže s dostatečnou přesností dávkovat vzorek o objemu ne méně než 5  $\mu\text{l}$ , horní limit je prakticky dán jen objemem mísící smyčky pumpy, ale se zvyšujícím se objemem dochází i k disperzi zóny vzorku v mísící cívce a ta je pro chromatografii nechtěná. Dávkování vzorku pomocí smyčky a přepínacího ventilu je také možné, zde je ale objem vzorku pevně dán objemem smyčky. Tento ventil je pak třeba zapojit navíc do systému SIC.

SIC je metoda na pomezí průtokových metod a kapalinové chromatografie, ale vzhledem ke klíčové roli chromatografické kolony je její zaměření na vzorky odpovídající kapalinové chromatografii. Průtokové metody často slouží právě pro úpravu vzorku před další analýzou, tedy se očekává, že dokáží zpracovat vzorky i se složitou maticí. Mohou tedy analyzovat vzorky přímo bez úpravy, a pokud je nutná úprava, není nutné tak striktní omezení, jakou formu a maticí má vzorek pro analýzu mít. Naopak SIC slouží k analýze vzorků, kde stanovujeme více analytů, s omezeným množstvím matrice a plně kompatibilních s chromatografickými podmínkami a kolonou. Vhodné složení vzorku je pro separaci v SIC velmi důležité a často velmi odlišné od zvyklostí v průtokových metodách, kde vyšší viskozita a drobné nečistoty nemusí být na závadu. I tato vlastnost se možná stala důvodem, proč se SIC prakticky příliš nerozšířila v komunitě průtokových metod.

Obecně lze říci, že SIC díky kratším kolonám separuje jednoduší směsi  $\approx 2-8$  analytů [36, 53]. Použití moderních chromatografických kolon a gradientové eluce ale tyto hranice jistě brzy překonají. Už teď se ale daří vývoj velmi rychlých separačních metod (1-3 min) jednodušších vzorků s využitím velmi krátkých kolon [51]. Logické je pak spojení více kroků v jedné metodě a provedení např. úpravy vzorku pomocí SPE a separace během jedné analýzy na jednom přístroji SIC [48, 49].

Příkladem použití SIC jsou stanovení účinných a pomocných látek ve farmaceutických [54] a veterinárních vzorcích [55], barviv v potravinách [56] a léčiv v biologických vzorcích [49]. Metoda byla také zapojena do řady studií nových krátkých kolon s použitím série strukturně podobných analytů [57].

### 3.2.7. Parametry ovládacího programu a separace

Obecnější popis podmínek separace v SIC je následující. Maximální objem mobilní fáze pro jednu separaci je závislý na velikosti pístu pumpy 4,0-10,0 ml, navíc zmenšený o objem 10-200  $\mu\text{l}$ , nutný pro nasátí vzorku. Opakované naplnění pístové pumpy je samozřejmě možné, ale znamená to další čas potřebný k naplnění pumpy, a tedy prodloužení analýzy. Složení mobilní fáze a tím i podmínky separace mohou být izokratické [44], ale i eluce využívající gradient je v SIC s jednou pumpou možná [58]. Příprava gradientu je možná několika způsoby: a) nasátím dvou mobilních fází postupně do mísící cívky pumpy, když relativně strmý a krátký gradient vznikne mísením zón obou fází pomocí disperze, b) postupným nasáváním a promýváním kolony různými mobilními fázemi, zde gradient vzniká až na koloně, nebo c) pumpováním dvou mobilních fází dvěma pumpami a mísením před kolonou v bodě T, tato možnost sice nejvíce koreluje s tvorbou gradientu v HPLC, ale vzhledem k chybějícímu odplynění, aktivnímu mísení, citlivosti na synchronizaci obou pump a tlakové změny jde spíše o experimentální formu v podobě metody MSC [59]. Chceme-li separovat analyty s výrazně odlišnými retenčními vlastnostmi, může být paralelní použití dvou kolon za izokratických podmínek alternativou ke gradientovým podmínkám. Takto na jedné koloně separujeme látky s nižší retencí a na druhé látky s vyšší retencí. Tento koncept byl představen pracovní skupinou průtokových metod na katedře analytické chemie FaF UK [60, 61].

Průtoková rychlost mobilní fáze úzce souvisí s tlakem v systému vznikajícím zejména díky odporu kolony vůči toku mobilní fáze. Běžné průtokové rychlosti v SIC jsou 5-30  $\mu\text{L s}^{-1}$  (0,3-1,8  $\text{ml min}^{-1}$ ), vyšší průtokové rychlosti lze použít u kratších monolitických kolon o standardním průměru 4,6 mm. Delší a užší monolity a částicové kolony vyžadují použití nižších průtoků, což má vliv zejména na délku analýzy. Vliv průtokové rychlosti na účinnost separace v SIC je za daných podmínek poměrně nevýznamný, protože se pohybujeme v ploché části Van Deemterovy křivky (experimentálně ověřeno). Příklad sekvence příkazů pro izokratickou separaci v SIC je uveden v *Tabulka 1*. Příklad sekvence příkazů pro SIC separaci s přípravou gradientu v mísící cívce pumpy je v *Tabulka 2*.

*Tabulka 1 - Program pro izokratickou separaci v SIC.*

Akce	Jednotka	Parametr
Nasátí mobilní fáze	Selekční ventil	Kanál 2 – Mobilní fáze
	Pumpa	Průtoková rychlost 4,2 $\text{ml min}^{-1}$ , Objem 3,80 ml
Nasátí vzorku do mísící cívky	Selekční ventil	Kanál 4 - Vzorek
	Pumpa	Průtoková rychlost 0,6 $\text{ml min}^{-1}$ , Objem 0,01 ml
Nástřik vzorku a separace	Selekční ventil	Kanál 3 - Kolona
	Pumpa	Průtoková rychlost 0,6 $\text{ml min}^{-1}$ , Objem 3,81 ml

Tabulka 2 - Program pro gradientovou separaci v SIC.

Akce	Jednotka	Parametr
Nasátí mobilní fáze 2 (vyšší eluční síla)	Selekční ventil	Kanál 8 – Mobilní fáze
	Pumpa	Průtoková rychlost 4,2 ml min <sup>-1</sup> , Objem 1,50 ml
Nasátí mobilní fáze 1 (nižší eluční síla)	Selekční ventil	Kanál 6 – Mobilní fáze
	Pumpa	Průtoková rychlost 4,2 ml min <sup>-1</sup> , Objem 0,55 ml
Nasátí vzorku do mísící cívky	Selekční ventil	Kanál 4 - Vzorek
	Pumpa	Průtoková rychlost 0,6 ml min <sup>-1</sup> , Objem 0,01 ml
Nástřik vzorku a separace	Selekční ventil	Kanál 3 - Kolona
	Pumpa	Průtoková rychlost 0,6 ml min <sup>-1</sup> , Objem 2,01 ml
Nasátí mobilní fáze 1 (nižší eluční síla)	Selekční ventil	Kanál 6 – Mobilní fáze
	Pumpa	Průtoková rychlost 4,2 ml min <sup>-1</sup> , Objem 0,10 ml
Rekondicionování kolony	Selekční ventil	Kanál 3 - Kolona
	Pumpa	Průtoková rychlost 0,6 ml min <sup>-1</sup> , Objem 0,10 ml

### 3.2.8. On-line spojení extrakce se separací

Flexibilita SIC přístroje a dlouhodobý vývoj průtokových metod pro potřeby automatizované úpravy vzorku [62], poukazují na velmi výhodné on-line spojení SIC a potřebné úpravy vzorku před separací v jediném přístroji během jednoho procesu. Metody SPE a LLE jako jedny z nejběžněji používaných metod jsou automatizovány s pomocí průtokových systémů velmi často. SPE kolona zapojená do SIC stejným způsobem jako chromatografická kolona umožňuje on-line uspořádání a provedení extrakce vzorku.

I když metody SPE a LC jsou formálně shodné, obě probíhají na koloně, jejich úlohy během analýzy jsou ale velmi odlišné. Cílem extrakce je oddělit matici od skupiny analyzovaných látek, ale zachovat vysokou výtěžnost kroku pro všechny analyty, umožnit rychlý nástřik většího množství vzorku pro zakoncentrování a zároveň rychlou eluci v minimálním objemu. Naopak separace předpokládá minimum matrice ve vzorku, nízký objem nástřiku vzorku a větší objem mobilní fáze pro účinnou separaci více analytů. Spojit tyto potřeby vyžaduje splnění mnoha podmínek. Často je jednodušší vyvíjet každý krok zvlášť a až poté kroky spojit on-line. Již od počátku je třeba myslet na potřebnou kompatibilitu obou kroků, jak chemickou, tak funkční. Například eluce z SPE kolony musí být v co nejmenší zóně, aby pak byla zóna vzorku co nejrychleji dávkována na chromatografickou kolonu a nebyla tak omezena efektivní separační délka kolony. I tak je většinou nástřik na chromatografickou kolonu vyšší než při samotné separaci. Separační účinnost tak může být částečně snížena, ale tím že je dávkován celý objem extrahovaného vzorku, je zvýšena citlivost celé analýzy. Toto je zřejmý rozdíl proti off-line přípravě vzorku před analýzou kdy sice dokážeme upravit vzorek do objemu např. 100-250 µl,

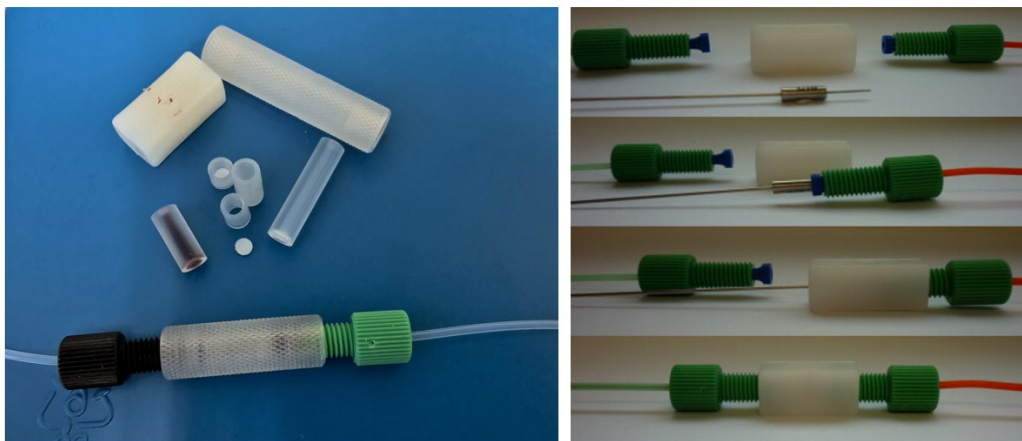
ale k chromatografické separaci je použita jen jeho část. Citlivosti tak ztrácíme na úkor možnosti opakované separace již upraveného vzorku.

Z technického hlediska je on-line spojení SPE a chromatografie již zavedené v 2D HPLC [63], ale přístroj SIC přesto přináší další výhody během vývoje metody, např. ve snazší změně parametrů pomocí programu, větší robustnosti při práci se složitější maticí a snazším čištěním při usazování vzorku v systému. Přínosem je i větší flexibilita toku a kontinuální detekce na výstupu z kolony umožňující sledovat i dávkování vzorku na kolonu.

Má-li být 2D metoda efektivní, musí být dodržena ortogonalita obou kroků. To znamená, že oba separační mechanismy jsou na sobě nezávislé (odlišné) a navzájem se doplňují [64]. Spojeny tak mohou být např. molekulový vylučovací mechanismus a reverzní fáze; iontově výměnný mechanismus a reverzní fáze; HILIC a reverzní fáze. Pořadí mechanismů lze i obrátit. Efekt ortogonalit lze dále podpořit redukcí mrtvého objemu mezi kolonami, použitím kolon pracujících za vyšších průtoků v druhé dimenzi, tedy monolitických kolon nebo částicových kolon s pevným jádrem a nastavením gradientových podmínek. Tato pravidla platí jak pro spojení 2D HPLC tak pro SPE-SIC.

Průtokové metody využívají různé formáty SPE kolon, nejčastěji jde o kolony vyrobené a plněné v laboratoři. Tyto kolony není obtížné připravit, držák/cartridge si zručný analytik se zkušenostmi s průtokovými metodami vyrobí z dostupného laboratorního materiálu, nebo ze široké škály komerčně dostupných dílů (*Obrázek 11 A*). Kolony tak mohou být plastové, kovové nebo skleněné s použitím plastových nebo kovových frit, případně i vaty pro fixaci sorbentu. K plnění nejčastěji slouží sorbent vyjmutý z klasických kolon pro manuální SPE. Díky jeho snadné dostupnosti a příznivé ceně lze se sorbentem snadno experimentovat, upravovat ho a v případě degradace nebo ucpání i kolonu znovu obnovit [21].

Pro průtokové metody jsou výhodné držáky kolon pro opakované plnění – mají vhodné rozměry 5-20 mm×1-2,5 mm a konektory kompatibilní s průtokovými systémy. Proti tomu, škála komerčně dostupných on-line SPE kolon je výrazně nižší, ale jejich výkonnost pro extrakce je často výrazně vyšší (bohužel i cena) než u laboratorně připravených kolon. Tyto kolony určené pro zapojení do HPLC systémů však mají někdy nižší porozitu a menší částice, a předpokládají tak vyšší pracovní tlaky, což může být pro průtokové metody limitující. Zajímavé jsou také komerčně vyráběné kolony MEPS (micro-extraction by packed sorbent), které lze snadno zapojit do průtokového systému a využít jejich malý rozměr pro miniaturizaci a vysokou opakovatelnost extrakce pro desítky až stovky vzorků (*Obrázek 11 B*) [49, 65].



A) Laboratorně připravené SPE kolony

B) Komerční kolona MEPS

*Obrázek 11 - Kolony vhodné pro on-line SPE v průtokových metodách.*

Také metoda extrakce z kapaliny do kapaliny je automatizovatelná pomocí průtokových metod mnoha způsoby [66], ale její kompatibilní on-line spojení se SIC je obtížné. Technické provedení není složité, ale fyzikálně-chemická kompatibilita vyžaduje mnoho kompromisů. V případě chromatografie na reverzních fázích jde např. o mísitelnost extrakčního rozpouštědla s mobilní fází a kompatibilitu v eluční síle extrakčního činidla a mobilní fáze. Kombinací jiných extrakčních a separačních módů lze tyto problémy omezit. Na praktické využití toto spojení zatím čeká, možná i z důvodu mnohem efektivnějšího a snadnějšího spojení SPE-SIC.

### 3.3. Kapalinová chromatografie

Základní charakteristiky kapalinové chromatografie nelze vynechat.

První, kdo využil jevů dnes známých jako chromatografická separace, byl v roce 1900 ruský botanik M. S. Cvet, když rozdělil s použitím sloupce tvořeného částicemi uhličitanu vápenatého promývaného směsí petroletheru a ethanolu vzorek rostlinných listových barviv. Pojem chromatografie, vycházející z práce s barvivy, použil až ve své pozdější práci v roce 1906 [67]. Teprve v polovině 20. století díky pracím dalších vědců došlo ke klíčovému rozvoji chromatografických technik, vedoucí až k dnes dominantní separační analytické metodě HPLC [68]. A. J. P. Martin a R. L. M. Synge obdrželi za chromatografii Nobelovu cenu v roce 1952.

Podstatou chromatografie je separace směsi látek na základě rozdílné distribuce v prostředí dvou nemísitelných fází. Jedna je nepohyblivá – stacionární a druhá je pohyblivá – mobilní. V případě vysoce účinné kapalinové chromatografie je stacionární fáze sorbent (částicový nebo monolitní), mající formu kolony, uzavřený v trubce z tlakově a chemicky odolného materiálu. Mobilní fáze zajišťuje pohyb separovaných látek v systému. Je to vhodná směs rozpouštědel protlačovaná přes kolonu směrem k detektoru pomocí vhodné pumpy. Je zřejmé, že způsobů, jak provádět kapalinovou chromatografii je mnoho, přesto formát přístroje známý jako HPLC naprosto dominuje. HPLC se skládá z vysokotlaké pumpy (nebo soustavy pump s mixerem mobilních fází), dávkovače vzorku (často ve formě autosampleru), separační kolony (umístěné v termostatu) a detektoru. Jednotlivé součásti jsou propojeny tlakově a chemicky odolnými kapilárami. Celý systém je ovládán pomocí software počítače, které zajišťuje i sběr a zpracování dat z detektoru.

Principem separace je díky dynamice celého procesu opakované ustalování rovnováhy dělených látek mezi obě fáze. Zde je také vidět společná vlastnost všech průtokových metod – práce mimo rovnovážný stav děje – v chromatografii sice směřuje látka k rovnovážnému stavu distribuce mezi fáze, ale díky pohybu mobilní fáze je tento stav opakovaně narušován. Dochází tak k pohybu separovaných látek kolonou. Parametry distribuce jsou charakterizovány distribuční konstantou  $K_D$  značící poměr mezi koncentrací látky ve stacionární a mobilní fázi, když pro separaci musíme nastavit takové podmínky, aby každá látka měla v daném systému odlišný  $K_D$ , tedy odlišnou retenci znamenající odlišný čas pohybu chromatografickou soustavou. Podmínky separace jsou ovlivněny povahou jak stacionární, tak mobilní fáze, a to i jejich změnami v čase. Při konstantních podmínkách mluvíme o izokratické eluci, při měnících se podmínkách (nejčastěji postupné zvyšování eluční síly mobilní fáze) mluvíme o gradientových podmínkách. Spektrum možného nastavení podmínek chromatografické separace je velice široké, cílem ale není dosáhnout nejlepší možné separace, cílem je dosáhnout separace, která bude splňovat zadané úkoly. Nejčastěji to jsou separace a dostatečná citlivost pro kvantifikaci všech požadovaných



analytů, krátký čas celé analýzy, efektivní využití a složení mobilní fáze (efektivní využití rozpouštědel). Cíle v moderní chromatografii shrnula Nováková a spol. v knize Moderní HPLC separace v teorii a praxi [69].

Separční mechanismy, uplatňované při chromatografii, závisí na vlastnostech obou fází a separované látky. Mezi typické mechanismy se řadí separace na základě nepolárních interakcí, nespecifických interakcí, disperzních sil, van der Waalových sil, iontové výměny, iontových párů, rozdílné rozpustnosti, rozdílné velikosti molekul, adsorpce, chirálně specifických interakcí a antigenních interakcí. Někdy je dominantní jeden mechanismus, někdy se jedná o kombinaci různých mechanismů. Chromatografie se tak rozděluje zejména na normální, reverzní, iontově výměnnou, HILIC, HIC, gelovou, afinitní a chirální [69].

Komerčně dostupné stacionární fáze jsou tvořené sorbentem ve formě těsně pakovaných částic, charakteristických pravidelným kulovitým tvarem, o průměru 1,5-5,0  $\mu\text{m}$  nebo ve formě monolitické tyčky charakteristické svou porozitou v jednotkách  $\mu\text{m}$ . Materiály tvořící sorbent dle chemického složení jsou anorganické oxidy (oxid křemičitý – silikagel, oxid zirkoničitý, oxid hlinitý, oxid titaničitý), různé polymery a pryskyřice a grafitický uhlík. Tyto materiály jsou dále hybridizovány nebo vrstveny pro dosažení lepší mechanické a chemické odolnosti, a modifikovány na aktivním povrchu, pro dosažení požadované selektivity. Vzhledem k neustálému vývoji se vlastnosti kolon neustále mění, ale stále lze považovat (aspoň dle většiny autorit) za standard kolonu o rozměru 150 mm  $\times$  4,6 mm, plněnou částicovým silikagelovým sorbentem o zrnitosti 5  $\mu\text{m}$  a chemickou modifikací oktadecylovými uhlíkatými řetězci. Tato kolona reprezentuje nejčastěji využívanou separaci na reverzních fázích. Zejména trend rychlých separací směřuje k produkci a použití kolon o menších rozměrech, menším průměru částic (často s pevným jádrem) a rozšířenou odolností v širokém rozmezí pH (1-12) [70].

Složení mobilní fáze se odvíjí od zvolené kolony a separovaného vzorku, cílem je nastavit eluční sílu potřebnou pro separaci. Různé separční módy vyžadují různou mobilní fázi, ale nejčastěji jde o binární nebo ternární směs. Rozpouštědla lze v jednotlivých módech uspořádat dle své eluční síly. Dle toho se odvíjí i příprava vhodné mobilní fáze. Např. separace na reverzních fázích a v HILIC nejčastěji využívají směsi methanolu nebo acetonitrilu s vodou, případně roztoky pufrů o různém pH. V iontově výměnné chromatografii je síla mobilní fáze dána zejména jejím pH, proto se široce používají kyseliny a zásady. Často dochází k překryvu módů, kdy je třeba mobilní fázi rozrušit různé interakce stacionární fáze s analyty, mobilní fáze pak nemusí mít jen typické složení. Pro přípravu je třeba použít vysoce čistá rozpouštědla, abychom nezvyšovali slepý signál (pozadí) detekce, docílili vysoké opakovatelnosti výsledků a přenositelnosti metody a, a nedegradovali kolonu postupným zanášením částicemi.

Mobilní fáze obsahující jednotlivé zóny se separovanými analyty je z kolony směřována do detektoru, kde dochází k vizualizaci celé separace ve formě chromatogramu (odezva detektoru v čase). Chromatogram je charakteristický křivkou skládající se z částí obsahující gausovské tvary, tedy píky odpovídající eluovaným zónám jednotlivých separovaných látek. Z velkého množství celkových i lokálních vlastností chromatogramu lze vyhodnotit velké množství parametrů separace, zejména však identitu separované látky z retenčního času maxima píku a množství látky z výšky píku (vzdáleností mezi základní linií a vrcholem píku) nebo odvozeně z plochy pod píkem (plocha ohraničená celým píkem a pomyslnou základní linií). Z těchto hodnot pak vypočítáme parametry separace – faktor symetrie, účinnost kolony a zdánlivý počet teoretických pater, kapacitu píku, rozlišení píků, poměr signálu k šumu a opakovatelnost retenčních času a odezvy detektoru [69].

V současné době je v HPLC využívána zejména nedestrukční optická detekce (spektrofotometrie a fluorescence) a destrukční hmotnostní detekce (hlavně měkké ionizační techniky), méně často jsou využívány elektrochemické a univerzální aerosolové detektory [69].

Chromatografická analýza je velmi složitý proces, proto i podmínky, které je nutné splnit pro cílenou separaci, jsou poměrně široké. Běžný přístroj HPLC je standardně nastaven a přizpůsoben tak, aby byla většina z nich splněna. Na operátorovi je jen vybrat kolonu, mobilní fázi a detekci tak, aby došlo k cílené separaci. I nastavení těchto podmínek může být přístrojem automatizováno, v případě přístroje vybaveného kolonovým selektorem s několika kolonami. Vhodně nastavený optimalizační program během testování podmínek vybere vhodnou kolonu, vhodné složení mobilní fáze a nastavení detekce pro požadované rozlišení píků jednotlivých analytů.

Metoda SIC využívá stejného schématu, a i když na první pohled nepřináší do samotné separace důležité vylepšení, koncept je mnohem flexibilnější a otevřenější. SIC ani ve své nejnovější verzi automatizované optimalizační nástroje nemá a je zejména na zkušenosti operátora nastavit podmínky nutné pro separaci. Zajímavým však může být třeba pro výuku, kde sofistikovaný přístroj HPLC neumožňuje bezprostřední sledování vlivu jednotlivých parametrů metody na výsledky separace. Náročnost optimalizace podmínek separace je zřejmě klíčový problém pro rozšíření SIC v komunitě pracující s průtokovými analyzátory (FIA, SIA), pro kterou je chromatografie většinou zcela nový obor.

### **3.3.1. Chromatografické kolony**

Kolona jako standardní forma stacionární fáze v HPLC, je využívána i v SIC. Díky koloně vznikla metoda SIC, proto je tato kapitola věnována významným vlastnostem monolitických a částicových kolon.

Konstrukci HPLC kolony lze obecně popsat jako tlakově odolný, dutý válec z nerezové oceli nebo chemicky inertního polymeru o vnitřním průměru 1-4,6 mm a délce/výšce válce 30-250 mm s ideálně hladkými vnitřními stěnami. Za kolony lze považovat i HPLC předkolony o délkách 1-10 mm, které našly své uplatnění v SIC jako separační kolony. Kolona je zcela vyplněna sorbentem sloužícím jako vlastní stacionární fáze. Sorbent má obvykle jednu ze dvou forem částicovou nebo monolitickou. V posledních letech díky rozvoji technologií cíleného leptání (v sorbentu jsou vytvářeny tvarově optimální kanálky pro průtok mobilní fáze umožňující vysoce efektivní separaci) [71] nebo naopak 3D tisku (sorbent je tištěn v optimální struktuře pro separaci) [72] dochází k novým možnostem ve výrobě kolon, ale komerční využití v HPLC zatím aktuální není. Částicové sorbenty naprosto dominují díky velmi širokému spektru svých vlastností (velikost částic, porozita, forma částic, funkční skupiny a různé způsoby ochrany před degradací). Monolitické kolony na bázi silikagelu sice papírově nabízí některé zajímavější parametry (vysoká porozita sorbentu přináší nízký zpětný tlak, vysoké průtokové rychlosti a vyšší odolnost proti ucpání maticí vzorku), ale v několika klíčových parametrech (kapacita, odolnost sorbentu při UHPLC tlacích a chemická odolnost při bazickém pH) velmi zaostávají a technologicky zatím není možné přijít s řešením [73].

HPLC kolony těží z celé řady vývojových trendů, zejména sorbenty s částicemi o velikosti menší než 2 mikrometry v UHPLC a s povrchově porézními částicemi přinesly nebývalý rozvoj [74].

#### *Monolitické kolony*

Sorbent monolitické kolony, na rozdíl od kolon částicových, je tvořen jedním kusem porézního materiálu, který je nejčastěji připraven polymerizací. Použité monomery a podmínky polymerizace jsou nastavovány tak, aby vznikl materiál, který má vysokou porozitu a velký aktivní povrch, což je klíčový předpoklad, aby se mohl stát kolonou pro chromatografii [75]. První práce, popisující monolitické kolony pro chromatografii, vznikly už v 70. letech 20. století, ale až na konci 80. let 20. století vznikly práce popisující přípravu a využití monolitických kolon v HPLC [76].

Monolitický sorbent v případě komerčně vyráběných HPLC kolon je buď silikagelový (anorganický) nebo polymerní (organický). I když základní schéma monolitu je v obou případech stejné, v klíčových detailech důležitých pro chromatografii, jde o velmi odlišné sorbenty [76, 77]. Komerční produkce kolon na bázi silikagelu stála u zrodu metody SIC [44]. Silikagelový sorbent vycházející z práce týmu N. Tanaky [78], komerčně uvedený firmou Merck na přelomu tisíciletí [50], je charakteristický dvojitou porézní strukturou. Makropóry o velikosti jednotek mikrometru vytvářejí vlastní prostory, kudy proudí mobilní fáze. Díky nim je zajištěn vysoký konvektivní tok mobilní fáze a významně urychlen přenos hmoty mezi mobilní a stacionární fází při zachování

relativně nízkého tlaku v systému. Mezopóry o velikosti okolo 10 nanometrů, vytvářejí vlastní aktivní povrch sorbentu. Díky mezopórům je aktivní povrch sorbentu vysoký a řádově srovnatelný s aktivním povrchem kolon plněných částicovým sorbentem (nejčastěji se srovnává s 5  $\mu\text{m}$  plně porézními částicemi). Způsob přípravy sorbentu je zatím pouze jeden, a navíc vyžaduje až sekundární umístění monolitické tyčky do pláště kolony díky objemové kontrakci monolitu během zrání. Silikagelový sorbent může být snadno modifikován funkčními skupinami (nejčastěji C18, C8, CN, NH<sub>2</sub>, nebo diol), korelující s typickými kolonami zejména pro separace malých molekul na reverzních fázích a v HILIC módu [78]. Silikagelové monolitické kolony jsou hodnoceny dle účinnosti separace stejně jako klasické částicové kolony. Hodnotami těchto parametrů lze snáze pochopit podobnost i rozdílnost obou typů sorbentů. Vysoká účinnost separace poukazuje na zvýšený přenos hmoty tedy na nižší hodnoty parametru C van Deemterovy rovnice než u částicových kolon. Díky vysoké porozitě sorbentu vykazují monolity výrazně nižší zpětný tlak, což zároveň umožňuje efektivně pracovat i za průtoků mobilní fáze 3-10 ml min<sup>-1</sup>, které nejsou pro částicové kolony efektivní. S tímto je spojená i možnost zapojení několika kolon do série a zvýšení separační účinnosti až na několik stovek tisíc teoretických pater. Naopak nevýhodou je velká spotřeba mobilní fáze/rozpouštědel a s ní spojená kompatibilita s některými detektory např. nebulizační nebo hmotnostní. Silikagelový sorbent má odpovídající pH (2-7,5) a teplotní stabilitu, kterou částicové sorbenty často překonávají [75].

Polymerní monolity mají podobnou makropórní strukturu, ale nemají strukturu mezopórů vhodnou pro retenci malých molekul, což znamená mnohem menší aktivní povrch sorbentu a výrazně odlišný mechanismus přenosu hmoty, a tedy retence látek. Výhodou je poměrně snadná příprava sorbentu uvnitř pláště kolony a velká variabilita možných monomerů a podmínek polymerizace. Výsledkem je široká škála vlastností, které může výsledná kolona mít. Záleží zejména na charakteru polymeru, tvaru kolony, struktuře a velikosti pórů sorbentu. Tyto vlastnosti určují účinnost separace, zpětný tlak a chemickou kompatibilitu sorbentu. Kolony tak lze cíleně optimalizovat pro zamýšlenou separaci nebo i pro extrakci na tuhé fázi [79], když často jsou vhodnější gradientové podmínky separace. Tvar kolony je často v kapilární (sub mm) formě, kde lze stále využít vysokou porozitu pro separace na (z pohledu HPLC) velmi dlouhých kolonách. Výhodou polymerního sorbentu (v závislosti na typu) je vysoká teplotní a chemická odolnost. Nejčastěji využívané polymery jsou polystyren-divinylbenzen, polyvinyl alkohol, polyakrylamid a metakrylát [76]. Polymerní monolitické kolony jsou svým využitím podobné polymerním částicovým kolonám, ale vzhledem k efektivnímu využití zejména pro separace velkých molekul např. v proteomice, se jejich použití v SIC zatím neobjevilo [80].

#### *Částicové kolony*

Částicové kolony, které jsou standardem v HPLC více než 40 let, nebyly vhodné pro zapojení v průtokových metodách, zejména díky vysokým tlakům způsobených relativně nízkou celkovou

porozitou kolony, standardními délkami 150-250 mm a také plně porózními částicemi, přes které část mobilní fáze musí protéct. Technologie povrchově porézních částic přinesla významnou inovaci v chromatografických kolonách. Díky neporéznímu jádru částic je významně zredukovaná efektivní vrstva částice a tím i zkrácená dráha mobilní fáze prostupující částicí. Výsledkem je zvýšená účinnost separace vyjádřená snížením členu C van Deemterovy rovnice asi o 25% a snížením členu A asi o 20%. To znamená, že lze používat vyšší průtoky mobilní fáze bez ztráty separační účinnosti. Díky vyšší uniformitě částic (dáno výrobou), je zároveň pravidelnější uspořádání lůžka kolony dále snižující pracovní tlak na koloně. Tento důvod byl hlavní motivací pro testování těchto kolon v SIC. Další důvod byla vyšší separační účinnost i u 2,7 a 5 $\mu$ m částic, která vedla výrobce k uvedení krátkých kolon (20-50 mm délky), mající účinnost shodnou nebo lepší než kolony s plně porózními částicemi o standardních délkách. Tyto kolony pracující při tlacích, které dokáže akceptovat SIC. Vzhledem k rozvinuté výrobní technologii tyto kolony produkuje celá řada výrobců a prakticky v kompletním portfolio modifikací stacionární fáze.

### 3.4. Extrakce na tuhou fázi

Extrakce na tuhou fázi (SPE) je široce využívanou metodou pro úpravu vzorku před chromatografickou analýzou. Jde sice o náročnější, vícekrokový proces, ale výsledná forma vzorku je vhodná pro následnou chromatografii. Cílem extrakce je nejčastěji rozdělit vzorek na dvě části. První část obsahuje látky, které chceme separovat v takové formě, aby separace upraveného vzorku byla dostatečně selektivní (odstranění interferující matrice) a citlivá (koncentrace látek odpovídala kalibračnímu rozsahu separace). Druhá část obsahuje vše ostatní, matrici nekompatibilní s podmínkami separace a interferující látky. Podmínky musí být nastaveny tak, aby se všechny analyty efektivně extrahovaly. Výsledek SPE opět závisí na nastavených podmínkách – formát a fyzikálně chemické vlastnosti sorbentu, počáteční úprava vzorku, extrahované analyty a matrice vzorku, a roztoky použité pro selektivní retenci analytu na sorbentu a pro eluci [81].

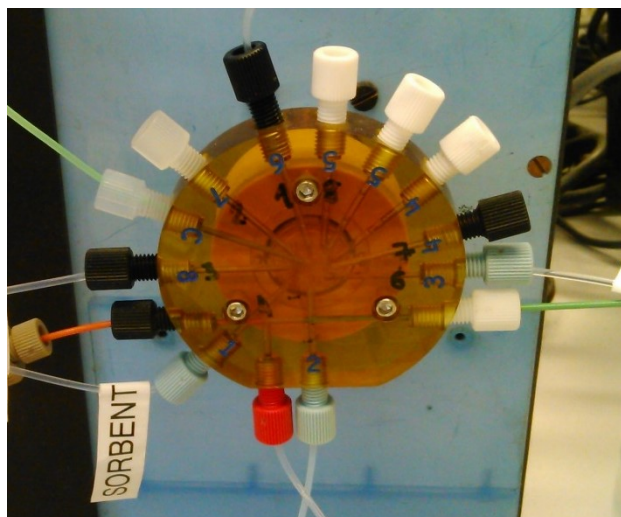
SPE proces se typicky skládá ze čtyř kroků: kondicionování kolony, nanesení vzorku na kolonu, promývání kolony s cílem odstranit interferující matrici a eluce cílových látek. V manuálním provedení jsou tyto kroky definovány objemy roztoků použitých pro jednotlivé kroky. To umožňuje homogenitu jednotlivých frakcí, nekompletní kompatibilitu jednotlivých kroků, efektivní sušení sorbentu a výměnu rozpouštědla (odpaření a rekonstituce). Roztoky se dají rozdělit jako „slabé“, které podporují retenci analytů na koloně a „silné“ které podporují eluci analytů z kolony. Složení vzorku je upravováno tak, aby bylo co nejvíce blízké slabým roztokům. Promývání kolony po nanesení vzorku se nejčastěji provádí slabým roztokem, nebo roztokem, který cíleně vymývá z kolony matrici a neovlivňuje retenci analytů na koloně. Eluce je prováděna dostatečně silným roztokem, který je kompatibilní s roztoky použitými v předcházejících krocích použity a zároveň je pokud možno kompatibilní s následným chromatografickým krokem. Pokud toto není možné, provádí se rekonstituce vzorku odpařením eluentu a převedením do kompatibilního rozpouštědla. Poměr koncentrací cílových analytů v upraveném a původním vzorku je charakterizován koncentračním faktorem, který souvisí i s výtěžností celého procesu. Celkově jde o nastavení kompromisu složení upraveného vzorku mezi vysokou koncentrací analytů, nízkou koncentrací interferující matrice a vhodným složením a objemem rozpouštědla pro další kroky analýzy [81].

I v SPE vývoj směřuje k miniaturizaci a ta je umožněna zejména automatizací. Automatizace pomocí průtokových metod znamená také některé odlišnosti od manuálního provedení SPE. V on-line provedení SPE je kolona promývána kontinuálně a nehomogenním složením toku. Je třeba počítat s tím, že podmínky se mění gradientově a k eluci dochází postupně [82]. Extrakce na tuhou fázi je z hlediska automatizovaného on-line provedení velmi příbuzná kapalinové chromatografii. Jedná se opět o zapojení kolony plněné sorbentem do průtokového systému, ale nastavení podmínek je v řadě parametrů odlišné. On-line SPE těžší z kontinuální detekce roztoků

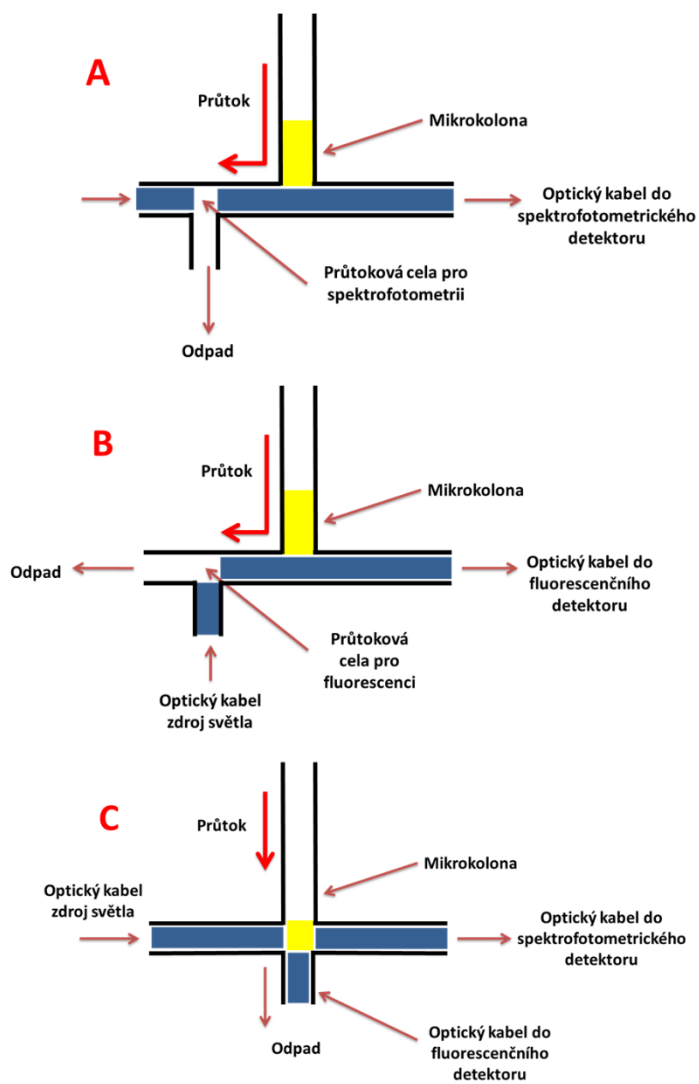
vycházejících z kolony. Zaznamenáváme tak děje ve všech krocích a snadno vyhodnotíme efektivitu retence analytů při nástřiku, odstranění matrice i eluce včetně kinetiky těchto dějů.

Výhodou automatizované SPE je miniaturizace a vysoká reprodukovatelnost podmínek (objemy jednotlivých roztoků a rychlost průtoku). Nevýhodou je menší možnost zakoncentrování – kroky jako sušení sorbentu a zejména rekonstituce vzorku jsou v on-line SPE a zejména při jeho očekávaném přímém spojení s analýzou velmi těžko proveditelné. On-line SPE předpokládá opakované použití extrakční kolony, tedy je třeba po každé extrakci zařadit efektivní odstranění zbytků matrice a rekondicionování kolony. Předpokladem dobře fungující kolony je její vhodná velikost a množství sorbentu, odpovídající objemu vzorku a používaným objemům, pro efektivní dávkování vzorku, promývání a rychlou eluci. Dále je důležité uniformní a stabilní naplnění sorbentu pro opakovatelnost a zamezení ztráty sorbentu, a chemická a tlaková odolnost celé kolony včetně konektorů. Na tyto vlastnosti je třeba brát zřetel zejména u laboratorně připravovaných kolon.

Jedna z alternativ ke kolonám plněným do držáku je Bead Injection (BI) metoda, využívající kolonu vytvořenou uvnitř kanálu průtokového systému, navíc s možností obnovení náplně sorbentu pro každý vzorek. Se sorbentem je manipulováno v toku ve formě suspenze. Tvorba lůžka kolony i jeho odstranění do odpadu je tedy plně automatizováno vlastním průtokovým systémem [21]. Původně byla tato zamýšlena metoda pro tvorbu kolon z pravidelných kulovitých materiálů na bázi polysacharidů, ale v principu funguje i s klasickým zlomkovým sorbentem pro SPE. BI je výhodná zejména pro extrakce, kde hrozí stárnutí sorbentu nebo zkřížená kontaminace při opakovaném použití kolony. Možností, kde a jak vytvořit mikrokolonu v průtokovém systému je opět několik, jeden z nich je přímo v nastavci Lab-On-Valve (*Obrázek 12*), přinášející další miniaturizaci a zkrácení průtokových drah. Originální jsou i možnosti detekce (*Obrázek 13*) buď na výstupu z kolony v eluátu (spektrofotometrie nebo fluorescence) nebo přímo na koloně, což přináší nové možnosti studia dějů přímo na sorbentu [83].



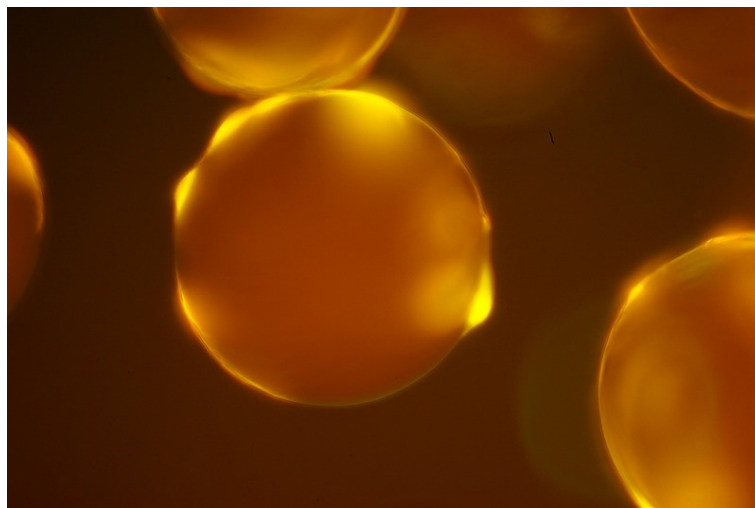
Obrázek 12 - Nástavec Lab-On-Valve na selektivním ventilu pro extrakci metodou *Bead Injection*.



Obrázek 13 - Možnosti detekce v Lab-On-Valve - (A) spektrofotometrie, (B) fluorescence, (C) duální detekce spektrofotometrie a fluorescence.



Zajímavostí polysacharidových nosičů je např. jejich možnost využití ke kultivaci buněčných linií, které lze pak jednoduše monitorovat za měnících se podmínek (*Obrázek 14*). Celkově jde o revoluční řešení, které ale na širší uplatnění v rutinní úpravě vzorků teprve čeká. Díky vlastnostem BI lze zvýšit efektivitu vývoje on-line SPE a následně pro rutinní práci pak využít extrakci s klasickou plněnou kolonou. Jedna z nevýhod tohoto provedení je nižší odolnost celého nástavce LOV vůči tlaku a tím i omezené možnosti zapojení do on-line 2D systému ve spojení s chromatografií.



*Obrázek 14 – Polysacharidové částice Cytodex s kultivovanými buňkami na povrchu [83].*

V on-line provedení je dominantním formátem extrakce cílená retence analytů. Jedná se o postup, kdy jsou cíleně na sorbentu zachytávány analyty, zatímco matrice a nežádoucí interferující látky jsou vzhledem k nižší retenci odstraněny před elucí analytů. Druhou variantou je cílená retence matrice, kdy kolona působí spíše jako filtr na vzorek. Analyty nejsou na koloně zachyceny a protékají skrz kolonu. Zachyceny jsou interferující látky a matrice. Dochází tak k přečištění/filtraci vzorku, ale jeho rozpouštědlo zůstává nezměněné, stejně tak koncentrace analytů (nedochází k zakoncentrování). Vzhledem k očekávanému opakovanému použití kolony v on-line SPE není druhá varianta příliš vhodná, jen s výjimkou LOV-BI, která naopak k tomuto postupu vybízí.

Extrakce na tuhou fázi, podobně jako chromatografie, využívá několik fyzikálně chemických dějů pro zachycení analytů na sorbentu (zejména snadno vratných dějů). Sorbenty lze takto rozdělit zejména na reverzní fáze, které využívají zejména nepolárních interakcí, disperzních a van der Waalových sil a díky tomu jsou velmi univerzální pro extrakce středně polárních a nepolárních analytů z polárního prostředí. Pro zrušení těchto interakcí slouží nepolární rozpouštědla (v praxi methanol a acetonitril), která tak slouží jako eluční činidla. Typickým materiálem pro tyto sorbenty je silikagel modifikovaný delšími alkylovými řetězci nebo dalšími nepolárními zbytky, polymery na bázi styrendivinybenzenu nebo grafitický uhlík [81, 84].

Normální fáze využívají hydrofilní interakce, zejména vodíkové vazby,  $\pi$ - $\pi$  interakce a dipolové interakce, a jsou vhodné pro extrakce polárních až středně polárních látek z nepolárního prostředí. Pro zrušení těchto interakcí, tedy jako eluent, slouží polární rozpouštědla (v praxi opět methanol, acetonitril, nebo isopropanol). Typickým materiálem těchto sorbentů je čistý silikagel anebo silikagel modifikovaný polárními zbytky (CN, NH<sub>2</sub>, nebo diol) nebo oxid hlinitý [84]. Iontová výměna, fungující na základě elektrostatické přitažlivosti, byla využívána už v polovině 20. století. Vhodná je pro extrakce polárních látek z vodných roztoků, když pro eluci je využíváno buď potlačení ionizace analytu nebo sorbetu změnou pH. Takto jsou rozděleny sorbenty na silné iontoměniče s nábojem v celém pracovním rozsahu pH nebo slabé iontoměniče, které jsou nabitě jen v pH daným disociační konstantou funkční skupiny [84]. Koordinačně-kovalentní vazby využívají chelatační (komplexační) sorbenty. Tato extrakce je využívána zejména pro analyty sloužící jako centrální ionty komplexů, jejichž ligandy jsou na povrchu sorbentu. Míra retence a eluce je dána hodnotou pH, např. u kovových iontů vyšší pH podporuje tvorbu komplexu/retenci a nižší pH eluci. V porovnání s iontoměniči je zajímavá selektivita těchto sorbentů pro vícemocné ionty [85]. Využívány jsou i selektivní interakce antigen-protilátka např. imunisorbenty [86], nebo tvarově specifické molekulárně vtištěné polymery [87]. Naopak využití adsorpce nebo molekulových sít umožňuje relativně nespecifické extrakce [82]. Sorbenty s částicemi s omezeným přístupem (RAM) jsou jednou z možností, jak zvýšit selektivitu retence nízkomolekulárních analytů a omezit retenci vysokomolekulární matrice. Odstranění matrice vzorku je tak efektivnější a sorbent snadno opakovaně použitelný, bez ztráty extrakční kapacity [88].

Klasická SPE využívá částicový sorbent, ale sorbent může být i monolitický [89], membránový [90] nebo tvořený nanovláknem [91]. Společnými znaky sorbentů pro SPE jsou vysoká porozita, dostatečná kapacita a robustnost při použití.

### 3.5. Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je velmi rozšířená metoda pro separaci a zakoncentrování analytů ze vzorku. Podstatou je rozdělení látek na základě fyzikálně chemických vlastností mezi dvě nemísitelné kapaliny. Možností uspořádání je velmi mnoho, stejně jako kombinací rozpouštědel a postupů jak zrychlit a zefektivnit celý proces. Jeden z velmi populárních postupů posledních let je využití disperzního činidla [92], změna polarity rozpouštědla [93] nebo narušení rozdělovací rovnováhy různými činidly s vysokou iontovou silou [94]. Klasická LLE má pouze jedno separační patro, což znamená malou selektivitu, ale velkou univerzálnost. Pro potřeby úpravy je malá selektivita výhodná, zajistí extrakci široké škály analytů, které jsou následně separovány. Selektivita ale může být zvyšována např. použitím selektivního činidla, které vytváří komplex s analytem, který je následně extrahován. Pak lze i tento extrakční proces použít pro vlastní analýzu [95].

Přestože manuální provedení může být miniaturizované, automatizace pomocí průtokových metod přináší další možnosti kromě miniaturizace, vyšší robustnost, selektivitu, úsporu rozpouštědel a provedení, která nejsou jednoduše manuálně proveditelná (dynamická extrakce).

Tak jak rozmanité mohou průtokové metody být, tak rozmanité jsou i způsoby automatizace LLE. Procesy se dají rozdělit na extrakce v rovnováze, kde extrakce probíhá v extrakční cele nebo díky metodě Lab-In-Syringe přímo v pístové pumpě [96], a na dynamickou extrakci, kdy extrakce probíhá uvnitř kapiláry a v dynamických podmínkách průtoku [66]. Další rozšíření možností je díky použití membrán a porózních materiálů [33].

Díky průtokovým metodám je pro analýzu zajímavé on-line spojení LLE s dalšími analytickými kroky, výhody flexibility průtokových metod pro automatizaci se projeví ještě více [97]. Variabilita tohoto spojení je obrovská s čímž souvisí i množství publikovaných prací [33, 66], které se jistě stanou podkladem jiných kvalifikačních prací.

## 4. Komentář k publikovaným pracím

Výsledky výzkumu prezentované v této habilitační práci vznikly v letech 2002 – 2019, během mého magisterského a doktorského studia na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy, během řešení PostDoc grantu GAČR a během dalšího působení na pozici vědeckého pracovníka na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy a University of Washington, USA.

Experimentální práce probíhaly převážně v Laboratoři průtokových metod a v dalších laboratořích na katedře analytické chemie Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy, dále v laboratořích Requimte, Dep. de Química Física, Faculdade de Farmácia, Porto, Portugalsko, v laboratořích Department of Chemistry, University of Washington, Seattle, USA, v laboratořích a Department of Oceanography, University of Hawaii, Honolulu, USA a v laboratořích Departamento de Química, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Dle cíle, zaměření a významnosti s ohledem na habilitační práci byly publikované práce rozděleny do následujících tematických okruhů:

1. Sekvenční injekční chromatografie  
18 prací zaměřených na vývoj metody, využití různých kolon, různé aplikace a spojení s úpravou vzorku
2. Sekvenční injekční analýza využívající kolony  
5 prací zaměřených na automatizaci extrakce na tuhou fázi a dalších kolonových technik
3. Sekvenční injekční analýza - ostatní aplikace  
7 prací zaměřených na extrakce z kapaliny do kapaliny, luminiscence a kalibrační strategie
4. Kapalinová chromatografie a úprava vzorku  
8 prací zaměřených na metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie, subkritické fluidní chromatografie a postupy pro úpravu vzorku před chromatografickou analýzou

## 4.1. Sekvenční injekční chromatografie

V této kapitole jsou komentovány publikace týkající se metody sekvenční injekční chromatografie, jak v její jednoduché formě popisující postupné kroky vývoje během počátků této metody až po spojení více kroků analýzy – extrakce a separace na jedné platformě SIC.

Mým štěstím bylo, že v rámci vypracování své diplomové práce jsem byl u toho, když metoda sekvenční injekční chromatografie vznikala. Její název vznikl již na počátku při diskuzích prvotních výsledků. Diplomová práce, společně ještě s dalšími experimentálními pracemi [98, 99], byla postavena na prvotních experimentech se zapojením komerčně vyráběné monolitické kolony do systému SIA (FIALab 3500). Článek „Monolithic columns - A new concept of separation in the sequential injection technique“ z roku 2003 vyšel v časopise *Analytica Chimica Acta* [44] a popisuje vlastní vytvoření a prvotní vývoj metody SIC s použitím monolitické kolony modifikované C18. Studovány byly různé aspekty originálního zapojení chromatografické kolony do průtokového systému a určován směr dalšího vývoje. Validace nové metody ukázala, že metoda dokáže být dostatečně přesná a správná v porovnání s HPLC. Její aplikace pro stanovení obsahové látky a dvou konzervačních látek v léčivém přípravku, ukázala potenciál metody pro použití ve farmaceutické analýze a rychlých separacích jednodušších vzorků. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® C18 25 mm×4,6 mm, mobilní fáze složená z acetonitrilu a vody (40:60, pH upraveno na 2,5) s gradientově měnící se rychlostí průtoku 8-20  $\mu\text{l sec}^{-1}$  a spektrofotometrická detekce při 275 nm. Stanovovány byly konzervační látky methylparaben a propylparaben a účinná látka diklofenak sodný v topickém gelu pro humánní účely. Výsledkem byl analýza jednoho vzorku za 8 min.

Další práce vznikly již za mého doktorského studia a následné akademické kariéry.

Článek „Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography“ z roku 2006 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení účinné látky a konzervační látky v nosních kapkách [54]. Práce v článku navazovala na prvotní analýzy s použitím SIC a byla zaměřena na další úpravy a přizpůsobení přístroje pro separace s použitím monolitické kolony. Při vývoji byly využity zkušenosti z vývoje metody na HPLC. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® C18 25 mm×4,6 mm, mobilní fáze složená methanolu a vody (40:65, pH upraveno na 5,5) a spektrofotometrická detekce při 220 a 256 nm. Stanovovány byly konzervační látka methylparaben a účinná látka nafazolin v nosních kapkách pro humánní účely. V článku jsou kriticky porovnány výsledky a vlastnosti metody SIC s možnostmi HPLC v roce 2006. Metoda SIC se jevila jako srovnatelná ve výsledcích (odpovídající požadavkům na lékopisná stanovení), nicméně pro rutinní analýzy velkého množství vzorků zatím vhodná nebyla.

Článek „Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system“ z roku 2006 v časopise *Journal of Separation Science* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení dvou účinných látek v očních kapkách [100]. Práce byla zaměřena na další úpravy a přizpůsobení přístroje pro separace s použitím monolitické kolony pro rychlou analýzu jednoduchých vzorků s využitím zkušeností z HPLC. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® C18 25 mm×4,6 mm, mobilní fáze složená acetonitrilu a vody (30:80) a spektrofotometrická detekce při 241 a 278 nm. Stanovovány byly chloramfenikol a betametason (dvě látky s poměrně odlišnými retenčními vlastnostmi) v humánních očních kapkách.

Článek „A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetone by sequential injection chromatography“ z roku 2007 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení dvou účinných látek v léčivém topickém roztoku pro humánní účely [101]. Práce byla zaměřena na využití delší kolony než v předchozích pracích 50 mm vs. 25 mm a další úpravy pro separace s použitím monolitické kolony. Pro měření byla použita monolitická kolona Phenomenex Onyx™ C18 50 mm×4,6 mm, mobilní fáze složená acetonitrilu a vody (35:65, pH upraveno na 3,3) a spektrofotometrická detekce při 240 nm. Stanovovány byly triamcinolon acetamid a kyselina salicylová v topickém roztoku pouze po jeho naředění a přidání propylparabenu jako vnitřního standardu.

Článek „Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column“ z roku 2008 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení dvou účinných látek v topickém veterinárním přípravku [55]. Práce byla zaměřena na použití kratší kolony než v předchozích pracích 10 mm vs. 25 mm pro efektivní separaci dvou látek s výrazně odlišnými chromatografickými vlastnostmi. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® C18 10 mm×4,6 mm, mobilní fáze složená acetonitrilu a vody (60:40) a spektrofotometrická detekce při 225 nm. Stanovovány byly fenoxycarb a permethrin ve třech druzích topických veterinárních přípravků – sprej, mechanický sprej a pěna.

Přehledový článek „An overview of sequential injection chromatography“ v časopise *Analytica Chimica Acta* popisuje směry vývoje, aktuální stav a další možnosti metody sekvenční injekční chromatografie od úplných počátků až do roku 2007, použití monolitických kolon v průtokových systémech a příklady metod využívající chromatografickou separaci v průtokových metodách [53]. Bylo jasné, že metoda překonala obtíže na počátku vývoje a přináší platformu pro chromatografické separace i pro automatizaci více krokových analýz (úprava vzorku). SIC se stala trendem v průtokových metodách, protože další výzkumné skupiny začaly využívat a dále rozvíjet koncept chromatografie v průtokových metodách.

Článek „Two-column Sequential Injection Chromatography—New approach for fast and effective analysis and its comparison with gradient elution chromatography“ z roku 2010 v časopise *Analytica Chimica Acta* popisuje výraznou inovaci v metodě SIC a v kapalinové chromatografii vůbec. Jedná se o paralelní použití dvou analytických kolon při izokratických podmínkách jako alternativu gradientové eluce pro separaci směsí s látek s výrazně odlišnými retenčními vlastnostmi [60]. Dvě monolitické kolony s odlišnou délkou a s použitím odlišných mobilních fází umožnily vytvořit odlišné podmínky pro separaci směsí látek s nižší a s vyšší retencí. Tento postup přináší několik zajímavých výhod – použití vhodné kolony pro každou ze skupin, izokratickou eluci, která je obecně jednodušší a robustnější na provedení a snížení celkového času analýzy v porovnání s gradientovou elucí. Vyvinutá metoda prokázala své schopnosti při stanovení paralen, kofeinu a propyfenazonu v tabletách s využitím kyseliny salicylové jako vnitřního standardu. Vyvinutý postup byl zaregistrován jako patent PV 2009-801 u Úřadu průmyslového vlastnictví v roce 2009 [61].

Článek „Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column“ z roku 2011 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC s použitím krátké HPLC kolony se silikagelovými částicemi s pevným jádrem modifikovaným C18 řetězcem [46]. Vlastnosti této kolony byly srovnávány s monolitickou kolonou s maximální možnou délkou pro použití v SIC (100 mm). Kolony byly srovnány podle výhodnosti svých parametrů pro použití v SIC, klíčový byl zejména zpětný tlak a účinnost separace. Pro porovnání byla využita metoda pro separaci pěti derivátů estrogenu s jen mírně odlišnými retenčními charakteristikami, které pomohly hodnotit separační účinnost obou kolon. Kolona s částicemi s pevným jádrem částicemi sice vytvářela výrazně vyšší zpětný tlak blížící se tlakovým limitům přístroje, ale zároveň prokázala výrazně vyšší separační účinnost díky moderní stacionární fázi tvořené 2,7  $\mu\text{m}$  částicemi. Tímto byl ustaven další milník ve vývoji SIC – možnost použití částicových kolon.

Článek „Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolithic column“ z roku 2011 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení léčiva a dvou degradačních produktů [58]. Práce byla zaměřena na vývoj metody využívající gradient vytvořený v mísící cívce SIC pumpy. Pro měření byla použita kolona Phenomenex Onyx™ C18 25 mm $\times$ 4,6 mm a mobilní fáze složená z acetonitrilu a 0,2% kyseliny fosforečné a spektrofotometrická detekce při 224, 237 a 305 nm. Stanovovány byly léčivo indometacin a dvě jeho nečistoty s použitím ketoprofenu jako vnitřního standardu. Výsledky metody byly porovnány s metodou HPLC využívající stejnou kolonu a velmi podobné podmínky separace. Způsob tvorby gradientu se ukázal jako efektivní a robustní pro použití v SIC, zároveň rozšířil možnosti separací v SIC o gradientově měnící se podmínky.

Článek „Separation of vitamins retinol acetate, ergocalciferol, or cholecalciferol and tocopherol acetate using sequential injection chromatography“ z roku 2011 v časopisu *Analytical Letters* popisuje vývoj metody SIC pro rychlé stanovení třech vitamínů rozpustných v tučích [102]. Práce byla zaměřena na vývoj metody s použitím monolitické kolony. Pro měření byla použita kolona Phenomenex Onyx™ C18 25 mm×4,6 mm, izokratické podmínky (mobilní fáze složená acetonitrilu, methanolu a vody) a spektrofotometrická detekce při 290 nm. Stanovovány byly vitamín A a D v humánních perorálních roztocích, a vitamín E byl použit jako vnitřní standard. Analýza trvala 6 min.

Článek „Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids“ z roku 2013 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody SIC s použitím tří kolon se silikagelovými částicemi s pevným jádrem modifikovaným C18 řetězcí, amidovými funkčními skupinami a fenylhexylovými funkčními skupinami [57]. Kolony byly srovnány podle výhodnosti svých parametrů pro použití v SIC pro separaci vybraných fenolických látek, kde klíčová je účinnost separace a selektivita. Kolony prokázaly podobně vysokou separační účinnost, ale selektivita separace byla závislá na použité modifikaci stacionární fáze. Pro porovnání byla použita směs sedmi fenolických kyselin s jen mírně odlišnými retenčními charakteristikami, které pomohly hodnotit separační účinnost kolon. Práce poukázala na výhody výrazně širšího spektra modifikací částicových kolon v porovnání s monolitickými kolonami.

Článek „Two-column sequential injection chromatography for fast isocratic separation of two analytes of greatly differing chemical properties“ z roku 2013 v časopise *Talanta* popisuje další aplikaci v SIC s paralelním použitím dvou kolon při izokratických podmínkách jako alternativu gradientové eluce pro separaci směsí s látkami s výrazně odlišnými retenčními vlastnostmi [103]. Práce rozvíjí koncept separace publikovaný poprvé v roce 2010 [60], kdy dvě monolitické kolony s odlišnou délkou a s použitím odlišných mobilních fází umožnili vytvořit odlišné podmínky pro separaci dvou látek s výrazně odlišnou retencí. Vyvinutá metoda prokázala své schopnosti při stanovení dexamethasonu a cinchokainu v humánních ušních kapkách. Výsledky a funkčnost celého konceptu byly ověřeny na HPLC, kde byla provedena srovnávací měření za izokratických i gradientových podmínek.

Článek „On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography“ z roku 2015 v časopise *Talanta* popisuje vývoj 2D metody spojující on-line SPE a chromatografickou separaci pomocí přístroje SIC [48]. Metoda efektivně spojuje krok úpravy vzorku se separací v jednom automatizovaném systému bez manuálních úkonů. Pro extrakci chemoterapeutik (sulfonamidů) byl použit sorbent se slabým aniontovým iontoměničím a pro separaci byla použita kolona se silikagelovými částicemi s pevným jádrem modifikovaná pentafluorofenylovými zbytky



(reverzní fáze). Vhodně zvolené podmínky obou kroků dokázaly díky ortogonalitě extrahovat cílové látky z vodných vzorků a přímý nástřik na separační kolonu při eluci z extrakční kolony. Studie vybraných sorbentů a podmínek pro oba kroky byla provedena na směsi osmi sulfonamidů. Výsledkem byla automatizovaná metoda on-line spojující extrakci a separaci umožňující stanovení 8 látek za méně než 11 minut.

Článek „On-line coupling of Micro-Extraction by Packed Sorbent with Sequential Injection Chromatography system for direct extraction and determination of betaxolol in human urine“ z roku 2015 v časopise *Talanta* popisuje vývoj 2D metody spojující on-line SPE a chromatografickou separaci pomocí přístroje SIC [49]. Metoda efektivně spojuje krok úpravy vzorku se separací v jednom automatizovaném systému bez manuálních úkonů. Pro extrakci betablokátoru betaxololu z lidské moči byl použit C18 sorbent v miniaturizované podobě MEPS (Micro-Extraction by Packed Sorbent) a pro separaci byla použita novější generace monolitické kolony modifikovaná C18 řetězci (reverzní fáze). Vhodně zvolené podmínky dokázaly extrahovat a zakoncentrovat cílovou látku z biologické matrice a následně umožnily přímý nástřik pro separaci. Citlivost a selektivita metody byla dosažena i díky použití fluorescenčního detektoru. Výsledkem byla metoda umožňující stanovení léčiva v biologickém vzorku za méně než 10 minut.

Článek „Sequential Injection Chromatography with post-column reaction/derivatization for the determination of transition metal cations in natural water samples“ z roku 2015 v časopise *Talanta* popisuje vývoj separační metody založené na SIC s použitím částicové kolony plněné iontoměničem [104]. Separované kovové kationty byly detekovány spektrofotometricky po postkolonové derivatizaci činidlem 4-(2-pyridylazo)resorcinol vytvářejícím barevné komplexy. Stanoveny byly ionty zinku, mědi a dvojmocného železa v povrchových vodách, při očekávaných sub-mikromolárních koncentracích.

Článek „Sub-1 min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation“ z roku 2017 v časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* popisuje vývoj metody SIC s použitím monolitické kolony (předkolona o délce 5 mm) modifikované nitrilovými zbytky (kyano skupina) umožňující separace v různých módech, nejen na reverzních fázích [51]. Díky velice krátké koloně, gradientové eluci a použité průtokové rychlosti  $3,0 \text{ ml min}^{-1}$  bylo dosaženo separace třech analytů za méně než 1 min s celkovou prostupností 30 vzorků za hodinu. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® CN 5 mm×4,6 mm, mobilní fáze s gradientově měnící se koncentrací octanu amonného, spektrofotometrická detekce při 480, 516 a 630 nm. Stanovovány byly 3 barviva – žlutý SY, azorubin a zeleň S ve farmaceutickém přípravku Coldrex horký nápoj lesní směs, když kromě ředění nebylo třeba žádné úpravy vzorku. Metoda použitím vysoké průtokové rychlosti mobilní fáze a gradientové eluce následuje přístupy rychlé chromatografie. Navíc pro separaci

nebyla použita žádná organická rozpouštědla a produkuje malé množství odpadu, tedy metoda splňuje některé z podmínek zelené chemie.

Článek „Fast separation of red colorants in beverages using cyano monolithic column in Sequential Injection Chromatography“ z roku 2017 v časopise *Microchemical Journal* popisuje vývoj metody SIC s použitím monolitické kolony modifikované nitrilovými zbytky (kyano skupina) umožňující separace v různých modech, nejen na reverzních fázích [56]. Vyvíjená metoda pro separace polárních ve vodě rozpustných potravinářských barviv využívala retenci látek na koloně díky různé iontové síle mobilní fáze. Pro měření byla použita kolona Merck Chromolith® CN 50 mm×4,6 mm, mobilní fáze s gradientově měnící se koncentrací fosforečnanu amonného, a spektrofotometrická detekce při 500 nm. Stanovovány byly 3 červená barviva – karmoisin a ponceau 4R v nealkoholických nápojích s využitím červeně 2G jako vnitřního standardu, když kromě ředění nebylo třeba žádné úpravy vzorku. Výsledkem byla rychlá separace barviv, která jsou sice v potravinářství legálně používaná, ale mají deklarovanou maximální denní dávku vzhledem k studiím prokázáním zdravotním komplikacím. Navíc pro separaci nebyla použita žádná organická rozpouštědla a produkuje malé množství odpadu, tedy metoda splňuje některé z podmínek zelené chemie.

Článek „Multilayered particle-packed column: Evaluation and comparison with monolithic and core-shell particle columns for the determination of red azo dyes in Sequential Injection Chromatography“ z roku 2017 v časopise *Microchemical Journal* popisuje vývoj metody SIC s použitím kolony s částicemi tvořenými hybridním vícevrstevným silikagelem modifikovaným C18 řetězci [105]. Vlastnosti této kolony byly srovnávány s monolitickými kolonami stejné délky a různé šířky a s kolonou plněnou povrchově porézními částicemi. Kolony byly srovnány podle výhodnosti svých parametrů pro použití v SIC, klíčový byl zejména zpětný tlak a účinnost separace. Kolona s hybridními částicemi prokázala velmi vyrovnané charakteristiky a vyšší účinnost než běžně používané monolitické kolony při jen mírně zvýšeném zpětném tlaku. Pro porovnání byla použita separace pěti nepolárních červených barviv (sudany) a jejich stanovení v ochucovadlech potravin a kořeních směsích, kde je jejich přítomnost nelegální.

## 4.2. Sekvenční injekční analýza využívající kolony

V této kapitole jsou komentovány publikace týkající se využití SIA metody pro automatizaci SPE a dalších kolonových technik. Blízkost se SIC je dána využitím kolony, podobnými mechanismy a logickou snahou o spojení extrakce (pro úpravu vzorku) a chromatografické separace (pro analýzu). Popisované metody fungují jako samostatné analýzy i jako testování možností pro on-line spojení kroků analýzy např. se sofistikovaným detektorem. První práce se částečně vymyká této kapitole, protože nejde o extrakci, ale sleduje děje přímo na koloně.

Článek „Two-parameter monitoring in a lab-on-valve manifold, applied to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements“ z roku 2009 v časopise *Analyst* popisuje vývoj a použití metody SIA Lab-On-Valve Bead Injection pro monitorování metabolismu buněčných linií, které byly kultivovány na polysacharidových částicích [83]. Z těchto částic byla pro každé měření v přístroji vytvořena mikrokolona na které docházelo k analýze. Dvojitá detekce umožnila kontinuálně fluorescenčně měřit aktivitu buněk s obarvenými organelami a spektrofotometricky množství/hustotu buněk na částicích pro korekci výsledků měření. Jde o originální přístup využití modulu LOV a analýzy živého biologického materiálu.

Článek „Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples“ z roku 2014 v časopise *Talanta* popisuje vývoj automatizované metody založené na průtokovém systému pro on-line zakoncentrování, fotodegradaci a fluorescenční detekci pesticidu v povrchových vodách [106]. Pro extrakční krok byla použita extrakce na tuhou fázi využívající minikolonu se sorbentem C18, a rychlá fotodegradace umožnila získat produkt, který byl následně selektivně stanoven pomocí fluorescenčního detektoru. Metoda byla validována a použita pro stanovení pesticidu methsulfuron methyl ve vodách z okolí města Bahía Blanca v Argentině.

Článek „Determination of trace zinc in seawater by coupling solid phase extraction and fluorescence detection in the Lab-On-Valve format“ z roku 2016 v časopise *Analytica Chimica Acta* popisuje vývoj mobilního přístroje pro stanovení stopových hladin zinku v mořské vodě pro analýzu na výzkumných lodích [107]. Metoda se skládala z extrakčního kroku s chelatačním sorbentem, který zakoncentroval vícemocné kovy a odstranil matici mořské vody, následovala selektivní derivatizace zinku fluorescenčním barvivem a selektivní fluorescenční detekce vzniklého derivátu. Díky dlouhodobým zkušenostem se stanovením stopových množství kovů v mořské vodě na pracovišti University of Hawaii at Manoa se podařilo vyvinout ojedinělou metodu, která by mohla stát na začátku nové éry využití průtokových metod v oceánografii.

Článek „Large volume preconcentration and determination of nanomolar concentrations of iron in seawater using a renewable cellulose 8-hydroquinoline sorbent microcolumn and universal approach of post-column eluate utilization in a Lab-on-Valve system“ z roku 2016 v časopise

Talanta popisuje vývoj metody SIA LOV-BI pro analýzu nízkých koncentrací železa v mořské vodě s možností využití pro další kovy [108]. Vývoj se zabýval optimalizací jednotlivých kroků automatizované metody, testováním chelatačních sorbentů s různými funkčními skupinami a studiem vlivu matrice na výsledky stanovení. Výsledkem byla univerzální, přenosná, a dostatečně selektivní a přesná metoda s potenciálem pro další rozvoj průtokových metod pro analýzy v oceánografii.

Článek „Fully automated method based on on-line molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for determination of lovastatin in dietary supplements containing red yeast rice“ z roku 2019 v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry* popisuje vývoj metody on-line SPE-SIA pro stanovení lovastatinu v potravních doplňcích obsahujících červenou rýži [87]. Stanovení je založeno na spektrofotometrické detekci po selektivní extrakci lovastatinu pomocí MIP sorbentu, který byl připraven s použitím simvastatinu jako templátové molekuly. Vývoj se zabývá optimalizací podmínek pro efektivní extrakci, eliminací matrice a ověřením selektivity extrakčního kroku. Výsledky stanovení lovastatinu v potravních doplňcích byly srovnatelné s manuálním provedením SPE a stanovením pomocí UHPLC-MS/MS. Výhoda on-line SPE-SIA metody je zejména v miniaturizaci a výrazně vyšší rychlosti celé analýzy.

### 4.3. Sekvenční injekční analýza - ostatní aplikace

V této kapitole jsou komentovány publikace popisující různé využití metody SIA pro automatizaci analytických postupů a metod, které nevyužívají kolonu, tedy nepatří do předchozích dvou kapitol. Popisované metody fungují díky selektivnímu kroku jako samostatné analýzy. Zařazeny jsou metody využívající selektivní detekci nebo kalibrační strategii pro vyhodnocení dat, extrakci z kapaliny do kapaliny a chemiluminiscenci.

Článek „New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control“ z roku 2008 v časopise *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* popisuje vývoj, evaluaci a použití iontově selektivních elektrod pro potenciometrickou detekci vitamínů B1 a B6 uzpůsobených pro použití v průtokových a chromatografických systémech [109]. Pro zvýšení selektivity jednotlivých sensorů byly použity membrány se zakotveným  $\beta$ -cyklodextrinem. Selektivita byla ověřena interferenčními studiemi s látkami očekávanými ve vzorcích. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení vitamínů B1 a B6 v tabletách a roztocích.

Článek „A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid-liquid extraction. Application for the determination of picric acid“ z roku 2010 v časopise *Analytica Chimica Acta* popisuje SIA systém upravený připojením druhé pumpy a druhého selektivního ventilu pro provedení miniaturizované extrakce z kapaliny do kapaliny a následné přímé spektrofotometrické detekce [110]. Zdvojení průtokového systému umožnilo pracovat odděleně s nemísitelnými kapalnými fázemi, vodnou (vzorek) a organickou (extrakční rozpouštědlo). Vlastní extrakce probíhala v extrakční jednotce vyrobené z mikrocentrifugační zkumavky s objemem 1,5 ml, která byla automaticky promývána během jednotlivých kroků extrakce a oddělování fází. Pro stanovení kyseliny pikrové byla využita tvorba selektivního barevného komplexu, který byl extrahován do organického rozpouštědla a detekován. Vyvinutý postup byl zaregistrován jako patent PV 2009-726 u Úřadu průmyslového vlastnictví v roce 2009 [111].

Článek „An air-assisted liquid-liquid extraction using a dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA): Determination of copper“ z roku 2010 v časopise *Analytical Methods* popisuje SIA systém upravený připojením druhé pumpy a druhého selektivního ventilu pro provedení miniaturizované extrakce z kapaliny do kapaliny a následné přímé spektrofotometrické detekce [112]. Zdvojení průtokového systému umožnilo pracovat odděleně s nemísitelnými kapalnými fázemi vodnou, (vzorek) a organickou (extrakční rozpouštědlo). Vlastní extrakce probíhala v extrakční jednotce vyrobené z mikrocentrifugační zkumavky s objemem 1,5 ml, která byla automaticky promývána během jednotlivých kroků extrakce a oddělování fází. Kinetika extrakce byla podpořena probubláváním extrakční směsi pomocí vzduchových bublin. Pro

stanovení mědi byla využita tvorba iontového asociátu extrahovaného do organického rozpouštědla - amylacetát. Výsledkem byla selektivní a miniaturizovaná metoda, která byla použita pro stanovení mědi ve farmaceutických vzorcích (tablety).

Článek „A non-extractive sequential injection method for determination of molybdenum“ z roku 2012 v časopise *Talanta* popisuje vývoj metody využívající selektivní derivatizační reakci s polymethinovým barvivem 2-[2-(4-dipropylamino-phenyl)-vinyl]-1,3,3-trimethyl-3H-indolium chlorid pro stanovení molybdenu ve vodě [113]. Vývoj metody se zaměřuje na rychlost, jednoduchost provedení a vysokou selektivitu metody (provedena interferenční studie). Detekce byla provedena při 550 nm (absorpční maximum derivatizačního činidla) a 620 nm (jedno z absorpčních maxim komplexu derivatizačního činidla s molybdenem). Výsledky měření byly srovnány s manuální metodou pro stanovení molybdenu ve vodě.

Článek „An automated method for monitoring aluminum in water samples based on a sequential injection platform“ z roku 2015 v časopise *Analytical Methods* popisuje vývoj automatizované průtokové metody pro stanovení hliníku v povrchových vodách s využitím selektivního činidla aluminon a jeho spektrofotometrickou detekci [114]. Selektivita metody pro použití ve vodných vzorcích byla potvrzena, metoda validována a výsledky porovnány s již publikovanými metodami, s měřením pomocí detekčních papírků a s manuální metodou prováděnou v kádince. Výsledkem byla velmi rychlá metoda 36 analýz za hodinu použitelná i pro měření mimo laboratoř.

Článek „Novel Approach to Two-Component Analysis Based on the Generalized Calibration Strategy“ z roku 2017 v časopise *Analytical Letters* popisuje vývoj metody pro dvoukomponentní analýzu využívající statistickou kalibrační metodu [24]. Metoda byla plně automatizovaná pomocí SIA a umožnila rychlou analýzu kofeinu a paracetamolu v léčivých přípravcích pomocí spektrofotometrické detekce. Metoda ověřila míru ovlivnění výsledků jak vzájemně mezi stanovovanými látkami, tak mezi analyzovanými látkami a dalšími pomocnými látkami ve vzorcích. Výsledky potvrdily možnost využití postupu využívající kalibrační strategii pro analýzu dvou analytů ve vzorku s výhodou vyšší rychlosti a jednoduchosti oproti podobně založeným metodám.

Článek „Quantum dots as chemiluminescence enhancers tested by sequential injection technique: Comparison of flow and flow-batch conditions“ z roku 2017 v časopise *Journal of Luminescence* popisuje charakterizaci kvantových částic použitých jako zesilovače chemiluminiscenčních reakcí v analýze [115]. Výsledky kontinuální a nekontinuální chemiluminiscenční detekce s využitím přímé a nepřímé luminiscenční metody byly srovnány. Obecněji nastavené podmínky měření ukázaly, že kvantové částice zvýšily chemiluminiscenční signál jen v některých koncentracích a za některých podmínek měření. Pro praktické využití je

tedy třeba vybrat jen jeden konkrétní druh kvantových částic, jednu z reakcí a detailně optimalizovat podmínky měření.

#### 4.4. Kapalinová chromatografie a úprava vzorku

V této kapitole jsou komentovány publikace popisující další práce zaměřené zejména na chromatografii využívající HPLC a SbFC, a postupy pro úpravu vzorku před chromatografickou analýzou. Práce často souvisí s prací na vývoji SIC a on-line SPE extrakce pomocí průtokových metod, které jsou komentovány v kapitolách 4.1. a 4.2.

Článek „High-resolution monolithic columns—a new tool for effective and quick separation“ z roku 2013 v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry* popisuje srovnání tří odlišných typů monolitických kolon s C18 sorbentem od firmy Merck [116]. Kolona s druhou generací monolitického sorbentu (nazvanou High Resolution) s rozměrem 100 mm×4,6 mm, se vyznačuje vyšší separační účinností, ale současně vyšším zpětným tlakem díky jinému poměru makropórů a mezopórů, než v případě první generace monolitického sorbentu. Kolona s rozměrem 100 mm×4,6 mm se sorbentem první generace, se vyznačuje vysokou porozitou, ale jen průměrnými separačními schopnostmi a stabilitou. Tato kolona byla brána jako výchozí pro srovnání. A třetí kolona s rozměrem 100×3 mm a monolitickým sorbentem první generace, je zajímavým kompromisem pro rychlé separace, vzhledem k redukovanému vnitřnímu objemu umožňující efektivnější využití mobilní fáze, při zachované separační účinnosti a jen částečně zvýšenému tlaku. Kolony byly testovány se směsí tří látek (kyselina askorbová, paracetamol a kofein), a dosažené parametry Van Deemterových křivek, separační účinnosti a pracovních tlaků za různého průtoku mobilní fáze byly srovnány. Každá z kolon ukázala své přednosti, když nová kolona s druhou generací sorbentu ukazuje evoluční posun směrem k univerzální koloně, přesto kolona s první generací sorbentů má velkou výhodu ve velmi nízkém pracovním tlaku a odolnosti proti zanášení maticí vzorků. Kolona s nižším průměrem významně šetří spotřebu mobilní fáze, ale také vyžaduje redukci mrtvého objemu celého chromatografu pro plné využití separačních schopností.

Článek „Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase“ z roku 2013 v časopise *Analytical and Bioanalytical Chemistry* popisuje vývoj jednoduché, rychlé a k životnímu prostředí šetrné HPLC metody pro stanovení čtyř obsahových látek v léčivém přípravku, které v systému reverzních fází mají velmi odlišné retenční vlastnosti [117]. Použití kolony Supelco Discovery HS PEG 15 mm×4 mm; částice 3 μm umožnilo použití izokratických podmínek separace s mobilní fází tvořenou pouze organickým pufrům. Součástí vývoje metody byla i studie retenčních charakteristik 17 farmaceutických látek na koloně při měnícím se koncentraci pufru a množství organického modifikátoru v mobilní fázi. Díky studii byly prokázány dva retenční módy sorbentu, iontově výměnný a mód reverzní fáze.



Článek „Fast HPLC Method for Determination of Fenoxycarb and Permethrin in Antiparasitic Veterinary Shampoo Using Fused-Core Column“ z roku 2013 v časopise *Chromatographia* popisuje vývoj a použití HPLC metody pro separaci insekticidů (fenoxykarb a permethrin) ve veterinárních přípravcích využívající kolonu s částicemi s pevným jádrem a modifikovanou amidovými zbytky [118]. Za optimalizovaných podmínek bylo dosaženo i kompletní separace dvou izomerů (cis a trans) permethrinu, nízkého času analýzy (6 min) a plné validace metody pro stanovení obsahových látek v komerčním antiparazitickém veterinárním šamponu.

Článek „Ultra-fast separation of estrogen steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles“ z roku 2014 v časopise *Talanta* popisuje jedno z prvních použití kolon s částicemi menšími než 2  $\mu\text{m}$  v subkritické fluidní chromatografii (SbFC) [119]. Pro testování a srovnání kolon a separačních podmínek byla použita směs derivátů estradiolu s velmi blízkými retenčními charakteristikami v HPLC. Výsledkem byla série velice rychlých separačních metod (<3 min), které sloužily ke srovnání vlastností kolon a vlivu podmínek (teplota, organický modifikátor, strmota gradientu a pracovní tlak) na separaci. Metoda zvolená jako optimální byla validována a srovnána s výsledky validace metody vyvinuté na UHPLC pro separaci stejné směsi látek. SbFC prokázala některé výhody a vysokou konkurenceschopnost s UHPLC jako nejpokročilejší separační metodou současnosti.

Článek „Sensitive Monitoring of Amygdalin and 5-Hydroxytryptamine in Food Supplements Using HILIC OH5 Chromatography“ z roku 2016 v časopise *Food Analytical Methods* popisuje vývoj metody pro stanovení amygdalinu – glykosidu obsaženého v peckách a jádrech rostlin čeledi Rosaceae [120]. Tato látka se stala součástí potravinových doplňků s potenciální protinádorovou aktivitou, která je zároveň toxická. Je tedy důležité kontrolovat její obsah v potravinách i potravních doplňcích. Zároveň metoda umožňovala stanovení serotoninu, který se také vyskytuje společně s amygdalinem v některých potravních doplňcích. Separace probíhala v módu HILIC, protože podmínky separace na reverzních fázích nejsou pro tyto relativně polární látky příliš vhodné (serotonin). Během vývoje bylo testováno 5 kolon s různě modifikovaným silikagelem a sledovaly se retenční charakteristiky za různých podmínek – obsah organického modifikátoru a pH mobilní fáze. Optimalizovaná metoda byla validována a použita pro stanovení obsahu amygdalinu a serotoninu ve vybraných potravních doplňcích.

Článek „Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger“ z roku 2017 v časopise *Food Analytical Methods* popisuje vývoj nového přístupu pro extrakci na tuhou fázi s využitím sorbentu dispergovaného do vzorku (disperzní SPE) před stanovením pomocí HPLC [121]. Při vývoji byly testovány různé sorbenty a parametry celého extrakčního postupu. Vyvinutá metoda byla použita pro extrakci významných látek z odvaru kořenu zázvoru a ze sirupu vyrobeného z kořene zázvoru. Připravené

vzorky byly analyzovány pomocí HPLC s použitím částicové kolony modifikované fenylhexylovými zbytky. Vyvinutá metoda dosáhla 50násobného zakoncentrování sledovaných látek, vysoké výtěžnosti a dostatečného odstranění matrice vzorků, nutného pro HPLC analýzu.

Článek „Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent“ z roku 2018 v časopise *Talanta* popisuje testování nanovláken s různou hustotou připravených z materiálu nylon 6 pro extrakci na tuhou fázi a jejich srovnání s komerčním částicovým sorbentem pro SPE [91]. Pro testování extrakce byly vybrány čtyři skupiny látek. Extrakce byla prováděna manuálně v klasických kolonách pro SPE s použitím vakua pro zrychlení průtoku přes kolony. Extrahované roztoky byly následně analyzovány pomocí HPLC-UV. Nanovláčka prokázala dobrou mechanickou stabilitu a chemickou odolnost odpovídající použitému polymeru. Výtěžnost extrakce a porozita kolony velmi záležela na způsobu pakování kolony, což je nevýhoda proti částicovým sorbentům. Možnost opakovatelného použití činí z nanovláken zajímavou alternativu například pro on-line SPE.

Článek „Determination of major phenolic compounds in apples: Part I—Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection“ z roku 2018 v časopise *Journal of Separation Science* popisuje vývoj HPLC metody pro stanovení fenolických látek v jablkách pro hodnocení změn během skladování u jednotlivých kultivarů [122]. Testováno bylo 11 kolon v módu reverzních fází z cílem separovat vybrané fenolické látky od šumu mrtvého objemu obsahující zbytky matrice a mezi sebou. Optimalizovaná metoda byla validována a použita pro analýzu extraktu z jablek.

## 5. Diskuse

Po vzniku a prvních pokusech byl vývoj SIC zaměřen zejména na odstranění klíčových problémů (dlouhodobá tlaková a chemická odolnost). Jakmile se metoda stala robustní, bylo možné pokračovat zejména ve vývoji chromatografické části. Postupně bylo rozšiřováno spektrum použitelných kolon a podmínek pro separaci složitějších vzorků.

### *Chromatografie – nová výzva pro průtokové metody?*

Dnešní analýza stále více směřuje od analýz zaměřených na jednu stanovovanou látku k multikomponentní analýze a dominantně k tomu používá separační metody, zejména chromatografii. Cíle, kterých by tak nově měly průtokové metody dosáhnout, jsou často dosaženy za použití stále složitějších schémat systému, použitím dalších pump, ventilů a dalších speciálních dílů (extraktory, dialyzátory, chipy, nebo další jednoúčelově vyrobené komponenty), a tím i složitějších sekvencí ovládacích příkazů.

Využití chromatografie v průtokových metodách s použitím vhodných kolon se proti tomu jeví jako jeden z logických a relativně snadno proveditelných kroků. Průtokový systém pro chromatografii je většinou jednoduchý (jednokanálový) s nezbytným minimem dílů a minimem potřebných kroků procesů. To umožňuje snazší vývoj metod a vyšší preciznost s využitím poměrně detailně popsaného a vysoce opakovatelného separačního procesu. Díky enormnímu vývoji je zřejmé, že ani v budoucnosti zájem o chromatografii nepoleví. Sorbenty mají stále vyšší účinnost, nové možnosti selektivity, a vyšší chemickou, teplotní a tlakovou odolnost. Rozšiřuje se nabídka kolon s délkou 2-5 cm, s relativně nízkým vnitřním objemem a relativně nízkým zpětným tlakem. Už teď je patrný i obnovený zájem o komerčně vyráběné monolitické kolony, tentokrát cílené na separace větších a velkých molekul.

Ano, metoda SIC se ukázala jako významný pokrok v oblasti průtokových metod a má potenciál pro další rozvoj díky trendům v chromatografii.

### *Splnila se očekávání spojená s chromatografií v průtokových metodách?*

S odstupem lze říci, že zatím jen částečně. Očekávání od monolitických kolon při jejich uvedení byla velká. V případě průtokových metod šlo zejména o možnost analýzy více analytů v jednom vzorku. Bohužel často díky menší znalosti detailů chromatografie a přílišné důvěře ve výrobci slíbené vlastnosti monolitických kolon, vedly první pokusy u mnoha pracovních skupin k rychlému vystřízlivění díky novému fenoménu zpětného tlaku v průtokovém systému. Rolí zřejmě sehrály neúspěchy při vývoji metod a nutné úpravě vzorků před separací i relativně vysoké

ceny kolon (v porovnání s jinými částmi průtokových systémů). Pokud ale byla očekávání realistická z ohledu tlaku, separační účinnosti a vzorků, stala se separace velkým přínosem pro průtokové metody. Možnost jednoduše analyzovat 3-6 analytů během jednoho měření navíc s vysokou opakovatelností, přesností a správností se stalo malou revolucí v průtokových metodách (přesněji řečeno novou generací). I když výrobci průtokových analyzátorů deklarovaly zájem o novou metodu, výsledkem byl pouze jeden komerční model SICrom™ (2009) (Obrázek 8) od firmy FIALab Instrumentals vyvinutý ve spolupráci s výzkumnou skupinou průtokových metod katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. SICrom™ umožňuje práci s běžnými rozpouštědly a krátkými kolonami, ale software pro práci s daty nebyl oproti SIA nijak upraven (nemí pracovat s chromatografickými píky). Z dlouhodobé praktické zkušenosti je zřejmé, že použitá pumpa trpí nižší životností spojenou s mizivou dostupností dílů, související s její ukončenou výrobou. Až v roce 2018 vznikl, opět díky spolupráci firmy FIALab Instrumentals s výzkumnou skupinou průtokových metod katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty v Hradci Králové, podstatně inovovaný systém SICrom™ II (FIALab Instrumentals) (Obrázek 9). Systém tentokrát využívá velmi robustní pumpu se stříkačkou z nerezové oceli a zřejmě umožní další rozvoj chromatografie v průtokových metodách.

Ano, očekávání spojená s chromatografií se naplňují, jen výrazně pomaleji než se původně předpokládalo.

#### *Jaká je role SIC v analytické chemii?*

Metoda SIC je jen nepatrným příspěvkem k vývoji a výzkumu v analytické chemii. Nemůže ani nedokáže konkurovat moderním UHPLC přístrojům ve většině parametrů. Nicméně velkým přínosem může být SIC při osvojování si pravidel a podmínek chromatografie během výuky. Díky dokonalosti ovládacího software a přednastaveným jednotlivým parametrům, je dnes častým jevem, že studenti porozumí chromatografii jen velmi omezeně. Jejich schopnost řešit složitější úkoly chromatografie, vyplívající z širokého spektra podmínek a možných vzorků, je pak nedostatečná.

Metoda SIC si stále zachovává vlastnosti zděděné po metodě SIA: otevřenost celého systému pro snadné úpravy, kompaktní rozměry umožňující přenosnost a jednoduché ovládání pro snadný vývoj metod a jednoduché sestavení pro snadnou údržbu. Při optimálním využití všech vlastností je metoda schopna selektivních, citlivých a i velmi rychlých analýz.

## 6. Shrnutí

Předložená habilitační práce přibližuje čtenáři vznik, první kroky, vývoj a současný stav relativně mladé analytické metody pro kolonovou kapalinovou chromatografii. Metoda založená na sekvenční injekční analýze díky zapojení separační kolony rozšířila možnosti průtokových metod o separaci a byla nazvána sekvenční injekční chromatografií. Na počátku musela řešit zcela nové úkoly a bylo třeba najít optimální díly a nastavení celého systému, tak aby výsledky vykazovaly parametry obvyklé pro kapalinovou chromatografii.

Práce popisuje koncept průtokových metod a jeho cestu k chromatografii ve formě sekvenční injekční chromatografie. Jsou popsány jednotlivé díly, nastavení parametrů a postupný vývoj schopností metody SIC nejen pro separaci vzorků, ale i pro její kombinaci s automatizovanou úpravou vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi.

V práci jsou i obsáhleji popsány základy HPLC a úpravy vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi a extrakce z kapaliny do kapaliny. Jsou zmíněny zejména klíčové vlastnosti, které pomohou lépe pochopit detaily převzaté metodou SIC a také on-line spojení úpravy vzorku se separací v SIC.

Komentované články autora se zaměřují zejména na metodu SIC, ale i na metody, které jsou v užším či širším kontextu blízké metodě SIC. Tématy jsou HPLC, úprava vzorku před chromatografií, využití selektivních kroků v průtokové analýze, různé způsoby selektivní detekce a nové materiály využitelné v analýze.

## 7. Závěr

Habilitační práce se věnuje poměrně mladé a dosud nepříliš rozšířené metodě kolonové kapalinové chromatografie – sekvenční injekční chromatografii. Metoda vznikla na základech sekvenční injekční analýzy a na začátku využívala komerční monolitické kolony pro chromatografické separace jednoduchých směsí. Svými vlastnostmi se jevila jako zajímavé rozšíření možností průtokových metod, které umí plnit velmi rozmanité úkoly analýzy, ale většinou cílené jen na jeden analyt. Postupný vývoj a rozšiřování úkolů metody sekvenční injekční chromatografie mě provází prakticky celým dosavadním vědeckým životem. I když se na první pohled v podstatě jedná o kopírování již široce etablované metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie, typické vlastnosti průtokových metod vybízejí k variabilitě, automatizaci, miniaturizaci, spojování jednotlivých kroků analýzy, ale i k hlubšímu studiu chromatografických a průtokových dějů, které díky dokonalosti dnešní instrumentace pro kapalinovou chromatografii mohou být na první pohled skryty. SIC tedy nabízí chromatografii v její původní jednoduchosti provedení, která sice neumožní zcela dosáhnout výsledků současné (U)HPLC, ale následuje trendy v chromatografii a slouží jako nástroj výzkumu a vývoje automatizovaných a miniaturizovaných analytických postupů. Zřejmým potenciálem SIC je se stát i výbornou učební pomůckou pro výuku kapalinové chromatografie a různých automatizovaných úprav vzorku, jakož i vícedimenzionálních metod včetně spojení s MS detekcí.

Z publikovaných prací a z výsledků spolupráce s dalšími pracovními skupinami a výrobci je zřejmé, že se povedlo postupně vyvinout a optimalizovat metodu, která má schopnosti plnit celou řadu analytických úkolů. Nastupující druhá generace komerčně vyráběného analyzátoru SICrom™ II, společně s neustálým vývojem chromatografických kolon, dává velkou naději na její další rozvoj a rozšíření schopností plnit aktuální úkoly analýzy. Také díky těmto vlastnostem se metoda SIC stala součástí projektu „Vytvoření expertního týmu pro pokročilý výzkum v separačních vědách (STARSS)“.

Vznik a vývoj metody SIC by nebyl možný bez komerčních monolitických kolon, vývoje v průtokových metodách, technologického vývoje jednotlivých součástí a dlouhodobé optimalizace celé metody. Z pohledu enormního vývoje kapalinové chromatografie posledních 20 let jde možná o relativně nepatrný příspěvek, ale průtokové metody již od počátku byly zaměřeny na hledání nových možností ve známých procesech využívaných pro analýzu a na rozvoj analýzy díky technologickému pokroku. Z aktuálních trendů je možné zmínit využití 3D tisku pro výrobu součástí průtokových analyzátorů, stejně tak pro výrobu nových chromatografických kolon, které znamenají nové výzvy v analytické chemii. Pro testování těchto novinek se SIC jeví jako výrazně lepší nástroj než relativně rigidní komerční (U)HPLC.

## 8. Použitá literatura

- [1] Hansen, E.H., *Chapter 1 Flow Injection Analysis: Its Origins and Progress*, in *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 3-21.
- [2] Růžička, J., Hansen, E.H., *Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1975. **78**(1): p. 145-157.
- [3] Skeggs Jr, L.T., *An automatic method for colorimetric analysis*. *American journal of clinical pathology*, 1957. **28**(3): p. 311-322.
- [4] SEAL Analytical, I. *Segmented Flow Analyzers*. [cited 2019 10. 1. 2019]; 2019:[Available from: <http://www.seal-analytical.com/Products/SegmentedFlowAnalyzers/QuAAtro39AutoAnalyzer/tabid/814/language/en-US/Default.aspx>].
- [5] Růžička, J., Marshall, G.D., *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. *Analytica Chimica Acta*, 1990. **237**(C): p. 329-343.
- [6] Reynolds, O., *On the dynamical theory of incompressible viscous fluids and the determination of the criterion*. *Proceedings of the Royal Society of London*, 1894. **56**(336-339): p. 40-45.
- [7] Růžička, J., *Chapter 2 From Beaker to Programmable Microfluidics*, in *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 23-44.
- [8] Kolev, S.D., *Mathematical modelling of flow-injection systems*. *Analytica Chimica Acta*, 1995. **308**(1-3): p. 36-66.
- [9] Christian, G.D., *Flow analysis and its role and importance in the analytical sciences*. *Analytica Chimica Acta*, 2003. **499**(1-2): p. 5-8.
- [10] Růžička, J., *From beaker chemistry to programmable microfluidics*. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 2005. **70**(11): p. 1737-1755.
- [11] Růžička, J., Hansen, E.H., Mosbaek, H., *Flow injection analysis. Part IX. A New Approach to Continuous Flow Titrations*. *Analytica Chimica Acta*, 1977. **92**(2): p. 235-249.
- [12] Růžička, J., Hansen, E.H., *Flow injection analysis. Part X. theory, techniques and trends*. *Analytica Chimica Acta*, 1978. **99**(1): p. 37-76.
- [13] Vidigal, S.S.M.P., Rangel, A.O.S.S., *A reagentless flow injection system for the quantification of ethanol in beverages based on the schlieren effect measurement*. *Microchemical Journal*, 2015. **121**: p. 107-111.
- [14] Růžička, J., *Redesigning flow injection after 40 years of development: Flow programming*. *Talanta*, 2018. **176**: p. 437-443.
- [15] Hatta, M., Measures, C.I., Růžička, J., *Programmable Flow Injection. Principle, methodology and application for trace analysis of iron in a sea water matrix*. *Talanta*, 2018. **178**: p. 698-703.
- [16] Růžička, J., Hansen, E.H., *Retro-review of flow-injection analysis*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2008. **27**(5): p. 390-393.
- [17] Horstkotte, B., Miró, M., Solich, P.J.A., Chemistry, B., *Where are modern flow techniques heading to?* 2018. **410**(25): p. 6361-6370.

- [18] Růžička, J. *Flow Injection Analysis - Tutorial*. 2018 [cited 2018 20/10/2018]; 2018:[Available from: <http://www.flowinjectiontutorial.com/>].
- [19] Paseková, H., Polášek, M., Solich, P., *Sequential injection analysis*. *Chemické Listy*, 1999. **93**(6): p. 354-359.
- [20] Schulz, C.M., Růžička, J., - *Micro sequential injection system for monitoring of metabolites extruded by cultured cells*, in *Lab-on-a-Chip*, R.E. Oosterbroek and A. van den Berg, Editors. 2003, Elsevier: Amsterdam. p. 171-184.
- [21] Růžička, J., *Lab-on valve: Universal microflow analyzer based on sequential and bead injection*. *Analyst*, 2000. **125**(6): p. 1053-1060.
- [22] Růžička, J., Ivaska, A., *Bioligand Interaction Assay by Flow Injection Absorptiometry*. *Analytical Chemistry*, 1997. **69**(24): p. 5024-5030.
- [23] Vakh, C., Falkova, M., Timofeeva, I., Moskvina, A., Moskvina, L., Bulatov, A., *Flow Analysis: A Novel Approach For Classification*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 2016. **46**(5): p. 374-388.
- [24] Chocholouš, P., Wiczorek, M., Świt, P., Kozak, J., Solich, P., Kościelniak, P., *Novel Approach to Two-Component Analysis Based on the Generalized Calibration Strategy*. *Analytical Letters*, 2017. **50**(4): p. 617-628.
- [25] Gómez, V., Miró, M., Callao, M.P., Cerdà, V., *Coupling of Sequential Injection Chromatography with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares for Enhancement of Peak Capacity*. *Analytical Chemistry*, 2007. **79**(20): p. 7767-7774.
- [26] Klimundová, J., Sklenářová, H., Schaefer, U.F., Solich, P., *Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005. **37**(5): p. 893-898.
- [27] Thouron, D., Vuillemin, R., Philippon, X., Lourenço, A., Provost, C., Cruzado, A., Garçon, V., *An Autonomous Nutrient Analyzer for Oceanic Long-Term in Situ Biogeochemical Monitoring*. *Analytical Chemistry*, 2003. **75**(11): p. 2601-2609.
- [28] Tzanavaras, P.D., Themelis, D.G., *Review of recent applications of flow injection spectrophotometry to pharmaceutical analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **588**(1): p. 1-9.
- [29] Klimundová, J., Šatínský, D., Sklenářová, H., Solich, P., *Automation of simultaneous release tests of two substances by sequential injection chromatography coupled with Franz cell*. *Talanta*, 2006. **69**(3): p. 730-735.
- [30] Calleri, E., Temporini, C., Perani, E., Stella, C., Rudaz, S., Lubda, D., Mellerio, G., Veuthey, J.L., Caccialanza, G., Massolini, G., *Development of a bioreactor based on trypsin immobilized on monolithic support for the on-line digestion and identification of proteins*. *Journal of Chromatography A*, 2004. **1045**(1): p. 99-109.
- [31] Miro, M., Hansen, E.H., *Solid reactors in sequential injection analysis: recent trends in the environmental field*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2006. **25**(3): p. 267-281.
- [32] Rocha, F.R.P., Batista, A.D., Melchert, W.R., Zagatto, E.A.G., *Solid-phase extractions in flow analysis*. *Anais Da Academia Brasileira De Ciencias*, 2018. **90**(1): p. 803-824.
- [33] Alexovič, M., Horstkotte, B., Solich, P., Sabo, J., *Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 2: Approaches based on impregnated membranes and porous supports*. *Analytica Chimica Acta*, 2016. **907**: p. 18-30.
- [34] Luque de Castro, M.D., *Chapter 8 Membrane-Based Separation Techniques: Dialysis, Gas Diffusion and Pervaporation*, in *Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 204-232.



- [35] Alexovič, M., Horstkotte, B., Šrámková, I., Solich, P., Sabo, J., *Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow-batch and in-syringe modes*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2017. **86**: p. 39-55.
- [36] Clavijo, S., Avivar, J., Suárez, R., Cerdà, V., *Analytical strategies for coupling separation and flow-injection techniques*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2015. **67**: p. 26-33.
- [37] Measures, C.I., Yuan, J., Resing, J.A., *Determination of iron in seawater by flow injection analysis using in-line preconcentration and spectrophotometric detection*. Marine Chemistry, 1995. **50**(1-4): p. 3-12.
- [38] Ferey, J., Da Silva, D., Colas, C., Nehmé, R., Lafite, P., Roy, V., Morin, P., Daniellou, R., Agrofoglio, L., Maunit, B., *Monitoring of successive phosphorylations of thymidine using free and immobilized human nucleoside/nucleotide kinases by Flow Injection Analysis with High-Resolution Mass Spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 2019. **1049**: p. 115-122.
- [39] de la Guardia, M., *Modern strategies for the rapid determination of metals in sewage sludges*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 1996. **15**(8): p. 311-318.
- [40] Price, D., Worsfold, P.J., Fauzi, R., Mantoura, C., *Determination of hydrogen peroxide in sea water by flow-injection analysis with chemiluminescence detection*. Analytica Chimica Acta, 1994. **298**(1): p. 121-128.
- [41] Tóth, I.D., Segundo, M. A., Rangel, A. O. S. S., Wang, J., Chen, X., Polášek, M., Pasquini, C., *Part IV: Applications of Flow Injection Analysis in Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 513-754.
- [42] Frenzel, W., McKelvie, I. D., Francis, P. S., Hogan, C. F., Hansen, E. H., Hansen, E. H., *Part III: Detection in Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 311-512.
- [43] Kubáň, P., Hauser, P. C., *Chapter 11 Flow Injection Analysis-Capillary Electrophoresis, in Advances in Flow Injection Analysis and Related Techniques*, S.D. Kolev, McKelvie I. D., Editor. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 287-310.
- [44] Šatínský, D., Solich, P., Chocholouš, P., Karlíček, R., *Monolithic columns - A new concept of separation in the sequential injection technique*. Analytica Chimica Acta, 2003. **499**(1-2): p. 205-214.
- [45] Gonzalez-San Miguel, H.M., Alpizar-Lorenzo, J.M., Cerdà, V., *Simultaneous determination of beta-lactamic antibiotics by a new high-performance low-pressure chromatographic system using a multisyringe burette coupled to a monolithic column (MSC)*. Anal Bioanal Chem, 2007. **387**(2): p. 663-71.
- [46] Chocholouš, P., Kosařová, L., Šatínský, D., Sklenářová, H., Solich, P., *Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography - Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column*. Talanta, 2011. **85**(2): p. 1129-1134.
- [47] Santos, J.R., Rangel, A.O.S.S., *Development of a chromatographic low pressure flow injection system using amperometric detection: Application to the analysis of niacin in coffee*. Food Chemistry, 2015. **187**: p. 152-158.
- [48] Batista, A.D., Chocholouš, P., Šatínský, D., Solich, P., Rocha, F.R.P., *On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography*. Talanta, 2015. **133**: p. 142-149.

- [49] Šrámková, I., Chocholouš, P., Sklenářová, H., Šatínský, D., *On-line coupling of Micro-Extraction by Packed Sorbent with Sequential Injection Chromatography system for direct extraction and determination of betaxolol in human urine*. *Talanta*, 2015. **143**: p. 132-137.
- [50] Cabrera, K., Wieland, G., Lubda, D., Nakanishi, K., Soga, N., Minakuchi, H., Unger, K.K., *SilicaROD(TM) - A new challenge in fast high-performance liquid chromatography separations*. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 1998. **17**(1): p. 50-53.
- [51] Davletbaeva, P., Chocholouš, P., Bulatov, A., Šatínský, D., Solich, P., *Sub-1 min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2017. **143**: p. 123-129.
- [52] Batista, A.D., Rocha, F.R.P., *On-column preconcentration in sequential injection chromatography: Application to determination of parabens*. *Analytical Methods*, 2015. **7**(10): p. 4371-4375.
- [53] Chocholouš, P., Solich, P., Šatínský, D., *An overview of sequential injection chromatography*. *Analytica Chimica Acta*, 2007. **600**(1-2 SPEC. ISS.): p. 129-135.
- [54] Chocholouš, P., Šatínský, D., Solich, P., *Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography*. *Talanta*, 2006. **70**(2): p. 408-413.
- [55] Chocholouš, P., Šatínský, D., Sladkovský, R., Pospíšilová, M., Solich, P., *Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column*. *Talanta*, 2008. **77**(2): p. 566-570.
- [56] Chocholouš, P., Dědková, L., Boháčová, T., Šatínský, D., Solich, P., *Fast separation of red colorants in beverages using cyano monolithic column in Sequential Injection Chromatography*. *Microchemical Journal*, 2017. **130**: p. 384-389.
- [57] Chocholouš, P., Vacková, J., Šrámková, I., Šatínský, D., Solich, P., *Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids*. *Talanta*, 2013. **103**: p. 221-227.
- [58] Koblová, P., Sklenářová, H., Chocholouš, P., Polásek, M., Solich, P., *Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolithic column*. *Talanta*, 2011. **84**(5): p. 1273-1277.
- [59] Fernández, C., Larrechi, M.S., Forteza, R., Cerdà, V., Callao, M.P., *Multisyringe chromatography (MSC) using a monolithic column for the determination of sulphonated azo dyes*. *Talanta*, 2010. **82**(1): p. 137-142.
- [60] 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. **668**(1): p. 61-66.
- [61] Solich, P., Šatínský, D., Chocholouš, P., Sklenářová, H., *Separace a detekce směsných vzorků sekvenční injekční chromatografií*, [2009-801], U. Karlova, Česká republika, 2009,
- [62] Economou, A., *Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment*. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 2005. **24**(5): p. 416-425.
- [63] Groskreutz, S.R., Swenson, M.M., Secor, L.B., Stoll, D.R., *Selective comprehensive multi-dimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography. Part I: Principles and instrumentation*. *Journal of Chromatography A*, 2012. **1228**: p. 31-40.

- [64] Jandera, P., *Column selectivity for two-dimensional liquid chromatography*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(12): p. 1763-1783.
- [65] Moein, M.M., Abdel-Rehim, A., Abdel-Rehim, M., *Microextraction by packed sorbent (MEPS)*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2015. **67**: p. 34-44.
- [66] Alexovič, M., Horstkotte, B., Solich, P., Sabo, J., *Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part I: Approaches based on extractant drop-, plug-, film- and microflow-formation*. Analytica Chimica Acta, 2016. **906**: p. 22-40.
- [67] Tsvett, M., *Adsorptionsanalyse und chromatographische Methode. Anwendung auf die Chemie des Chlorophylls*. Berichte der Deutschen botanischen Gesellschaft, 1906. **24**: p. 384-393.
- [68] Horvath, C., *High-performance ion-exchange chromatography with narrow-bore columns: rapid analysis of nucleic acid constituents at the subnanomole level*. Methods of biochemical analysis, 1973. **21**: p. 79-154.
- [69] Nováková, L., Douša, M.a.k., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 2013, Praha: Lucie Nováková, Michal Douša. 299.
- [70] Nováková, L., Svoboda, P., Pavlík, J., *Ultra-high performance liquid chromatography*, in *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: Second Edition*. 2017. p. 719-769.
- [71] De Malsche, W., Eghbali, H., Clicq, D., Vangeloooven, J., Gardeniers, H., Desmet, G., *Pressure-driven reverse-phase liquid chromatography separations in ordered nonporous pillar array columns*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(15): p. 5915-5926.
- [72] Nawada, S., Dimartino, S., Fee, C., *Dispersion behavior of 3D-printed columns with homogeneous microstructures comprising differing element shapes*. Chemical Engineering Science, 2017. **164**: p. 90-98.
- [73] Vyviurska, O., Lv, Y.Q., Mann, B.F., Švec, F., *Comparison of commercial organic polymer-based and silica-based monolithic columns using mixtures of analytes differing in size and chemistry*. Journal of Separation Science, 2018. **41**(7): p. 1558-1566.
- [74] Fekete, S., Veuthey, J.L., Guilleme, D., *Comparison of the most recent chromatographic approaches applied for fast and high resolution separations: Theory and practice*. Journal of Chromatography A, 2015. **1408**: p. 1-14.
- [75] Guiochon, G., *Monolithic columns in high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2007. **1168**(1): p. 101-168.
- [76] Švec, F., *Monolithic columns: A historical overview*. Electrophoresis, 2017. **38**(22-23): p. 2810-2820.
- [77] Causon, T.J., Nischang, I., *Critical differences in chromatographic properties of silica- and polymer-based monoliths*. Journal of Chromatography A, 2014. **1358**: p. 165-171.
- [78] Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N., Ishizuka, N., Tanaka, N., *Octadecylsilylated Porous Silica Rods as Separation Media for Reversed-Phase Liquid Chromatography*. Analytical Chemistry, 1996. **68**(19): p. 3498-3501.
- [79] Švec, F., Lv, Y., *Advances and Recent Trends in the Field of Monolithic Columns for Chromatography*. Analytical Chemistry, 2015. **87**(1): p. 250-273.
- [80] Eeltink, S., Wouters, S., Dores-Sousa, J.L., Švec, F., *Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides*. Journal of Chromatography A, 2017. **1498**: p. 8-21.

- [81] Nováková, L., Vlčková, H., *A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation*. Analytica Chimica Acta, 2009. **656**(1-2): p. 8-35.
- [82] Majors, R.E., *Sample preparation fundamentals for chromatography*. 2013, Canada: Agilent Technologies, Inc. 364.
- [83] Lähdesmäki, I., Chocholouš, P., Carroll, A.D., Anderson, J., Rabinovitch, P.S., Růžička, J., *Two-parameter monitoring in a lab-on-valve manifold, applied to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements*. Analyst, 2009. **134**(7): p. 1498-1504.
- [84] Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., Cerdà, V., *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **80**: p. 641-654.
- [85] Sohrin, Y., Urushihara, S., Nakatsuka, S., Kono, T., Higo, E., Minami, T., Norisuye, K., Umetani, S., *Multielemental determination of GEOTRACES key trace metals in seawater by ICPMS after preconcentration using an ethylenediaminetriacetic acid chelating resin*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(16): p. 6267-6273.
- [86] Erxleben, H., Růžička, J., *Sequential affinity chromatography miniaturized within a "lab-on-valve" system*. Analyst, 2005. **130**(4): p. 469-471.
- [87] Novosvětská, L., Chocholouš, P., Švec, F., Sklenářová, H., *Fully automated method based on on-line molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for determination of lovastatin in dietary supplements containing red yeast rice*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1554-0>
- [88] Huclová, J., Šatínský, D., Maia, T., Karlíček, R., Solich, P., Araújo, A.N., *Sequential injection extraction based on restricted access material for determination of furosemide in serum*. Journal of Chromatography A, 2005. **1087**(1-2): p. 245-251.
- [89] Masini, J.C., Švec, F., *Porous monoliths for on-line sample preparation: A review*. Analytica Chimica Acta, 2017. **964**: p. 24-44.
- [90] Hagen, D.F., Markell, C.G., Schmitt, G.A., Blevins, D.D., *Membrane approach to solid-phase extractions*. Analytica Chimica Acta, 1990. **236**(C): p. 157-164.
- [91] Háková, M., Raabová, H., Havlíková, L.C., Chocholouš, P., Chvojka, J., Šatínský, D., *Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent*. Talanta, 2018. **181**: p. 326-332.
- [92] Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S., *Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction*. Journal of Chromatography A, 2006. **1116**(1-2): p. 1-9.
- [93] Jessop, P.G., Phan, L., Carrier, A., Robinson, S., Dürr, C.J., Harjani, J.R., *A solvent having switchable hydrophilicity*. Green Chemistry, 2010. **12**(5): p. 809-814.
- [94] Tang, Y.Q., Weng, N., *Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis*. Bioanalysis, 2013. **5**(12): p. 1583-1598.
- [95] Andruch, V., Acebal, C.C., Škrliková, J., Sklenářová, H., Solich, P., Balogh, I.S., Billes, F., Kocúrová, L., *Automated on-line dispersive liquid-liquid microextraction based on a sequential injection system*. Microchemical Journal, 2012. **100**(1): p. 77-82.
- [96] Maya, F., Horstkotte, B., Estela, J.M., Cerdà, V., *Automated in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 2014. **59**: p. 1-8.

- [97] Horstkotte, B., Lopez de los Mozos Atochero, N., Solich, P., *Lab-In-Syringe automation of stirring-assisted room-temperature headspace extraction coupled online to gas chromatography with flame ionization detection for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in surface waters*. Journal of Chromatography A, 2018. **1555**: p. 1-9.
- [98] 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. **1015**(1-2): p. 239-244.
- [99] Huclová, J., Šatínský, D., Karlíček, R., *Coupling of monolithic columns with sequential injection technique: A new separation approach in flow methods*. Analytica Chimica Acta, 2003. **494**(1-2): p. 133-140.
- [100] Šatínský, D., Chocholouš, P., Salabová, M., Solich, P., *Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system*. Journal of Separation Science, 2006. **29**(16): p. 2494-2499.
- [101] Chocholouš, P., Holík, P., Šatínský, D., Solich, P., *A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetate by sequential injection chromatography*. Talanta, 2007. **72**(2): p. 854-858.
- [102] Sklenářová, H., Koblová, P., Chocholouš, P., Šatínský, D., Krčmová, L., Kašparová, M., Solichová, D., Solich, P., *Separation of vitamins retinol acetate, ergocalciferol, or cholecalciferol and tocopherol acetate using sequential injection chromatography*. Analytical Letters, 2011. **44**(1-3): p. 446-456.
- [103] Šatínský, D., Chocholouš, P., Válová, O., Hanusová, L., Solich, P., *Two-column sequential injection chromatography for fast isocratic separation of two analytes of greatly differing chemical properties*. Talanta, 2013. **114**: p. 311-317.
- [104] Horstkotte, B., Jarošová, P., Chocholouš, P., Sklenářová, H., Solich, P., *Sequential injection chromatography with post-column reaction/derivatization for the determination of transition metal cations in natural water samples*. Talanta, 2015. **136**: p. 75-83.
- [105] Chocholouš, P., Gil, R., Acebal, C.C., Kubala, V., Šatínský, D., Solich, P., *Multilayered particle-packed column: Evaluation and comparison with monolithic and core-shell particle columns for the determination of red azo dyes in Sequential Injection Chromatography*. Journal of Separation Science, 2017. **40**(6): p. 1225-1233.
- [106] Acebal, C.C., Grünhut, M., Šrámková, I., Chocholouš, P., Lista, A.G., Sklenářová, H., Solich, P., Band, B.S.F., *Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples*. Talanta, 2014. **129**: p. 233-240.
- [107] Grand, M.M., Chocholouš, P., Růžička, J., Solich, P., Measures, C.I., *Determination of trace zinc in seawater by coupling solid phase extraction and fluorescence detection in the Lab-On-Valve format*. Analytica Chimica Acta, 2016. **923**: p. 45-54.
- [108] Horstkotte, B., Chocholouš, P., Solich, P., *Large volume preconcentration and determination of nanomolar concentrations of iron in seawater using a renewable cellulose 8-hydroquinoline sorbent microcolumn and universal approach of post-column eluate utilization in a Lab-on-Valve system*. Talanta, 2016. **150**: p. 213-223.
- [109] Pires, A.R., Araújo, A.N., Montenegro, M.C.B.S.M., Chocholouš, P., Solich, P., *New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2008. **46**(4): p. 683-691.

- [110] Škrliková, J., Andruch, V., Sklenářová, H., Chocholouš, P., Solich, P., Balogh, I.S., *A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid-liquid extraction. Application for the determination of picric acid.* Analytica Chimica Acta, 2010. **666**(1-2): p. 55-61.
- [111] Solich, P., Sklenářová, H., Chocholouš, P., Andruch, V., Škrliková, J., *Zařízení sekvenční injekční analýzy pro extrakci kapalina-kapalina*, [2009-726], U. Karlova, Česká republika, 2009,
- [112] Škrliková, J., Andruch, V., Sklenářová, H., Chocholouš, P., Solich, P., Balogh, I.S., *An air-assisted liquid-liquid extraction using a dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA): Determination of copper.* Analytical Methods, 2010. **2**(8): p. 1134-1139.
- [113] Lešková, M., Sklenářová, H., Bazel, Y., Chocholouš, P., Solich, P., Andruch, V., *A non-extractive sequential injection method for determination of molybdenum.* Talanta, 2012. **96**: p. 185-189.
- [114] Sklenářová, H., Fialová, B., Šandrejová, J., Chocholouš, P., Solich, P., *An automated method for monitoring aluminum in water samples based on a sequential injection platform.* Analytical Methods, 2015. **7**(13): p. 5530-5537.
- [115] Sklenářová, H., Voráčová, I., Chocholouš, P., Polásek, M., *Quantum dots as chemiluminescence enhancers tested by sequential injection technique: Comparison of flow and flow-batch conditions.* Journal of Luminescence, 2017. **184**: p. 235-241.
- [116] Sklenářová, H., Chocholouš, P., Koblková, P., Zahálka, L., Šatínský, D., Matysová, L., Solich, P., *High-resolution monolithic columns - A new tool for effective and quick separation.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(7): p. 2255-2263.
- [117] Šatínský, D., Brabcová, I., Maroušková, A., Chocholouš, P., Solich, P., *Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(18): p. 6105-6115.
- [118] Šatínský, D., Kameníčková, D., Chocholouš, P., Solich, P., *Fast HPLC method for determination of fenoxycarb and permethrin in antiparasitic veterinary shampoo using fused-core column.* Chromatographia, 2013. **76**(21-22): p. 1559-1564.
- [119] Nováková, L., Chocholouš, P., Solich, P., *Ultra-fast separation of estrogen steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles.* Talanta, 2014. **121**: p. 178-186.
- [120] Havlíková, L., Parmová, M., Chocholouš, P., Solich, P., *Sensitive Monitoring of Amygdalin and 5-Hydroxytryptamine in Food Supplements Using HILIC OH5 Chromatography.* Food Analytical Methods, 2016. **9**(6): p. 1849-1856.
- [121] Havlíková, L.C., Urbanová, M., Chocholouš, P., Solich, P., *Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger.* Food Analytical Methods, 2017. **10**(4): p. 1016-1023.
- [122] Sklenářová, H., Bílková, A., Pechová, M., Chocholouš, P., *Determination of major phenolic compounds in apples: Part I—Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection.* Journal of Separation Science, 2018. **41**(15): p. 3042-3050.

## 9. Podíl autora habilitační práce na předložených publikačních výstupech

Práce jsou uvedeny chronologicky a podíl autora je stručně komentován.

Autor habilitační práce je podtržen u prací, na kterých je první autor nebo korespondující autor.

U každé práce je uveden odkaz na elektronické informační zdroje (aktualizováno k 21/1/2019).

IF = IF 2017

Q1-Q4 = JIF Quartile

1. Šatínský, D.; Solich, P.; **Chocholouš, P.**; Karlíček, R.  
Monolithic columns - A new concept of separation in the sequential injection technique.  
*Analytica Chimica Acta* 2003, 499 (1-2), 205-214. (IF: **5.123 - Q1**)  
[https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00625-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00625-1)  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce
2. **Chocholouš, P.**; Šatínský, D.; Solich, P.  
Fast simultaneous spectrophotometric determination of naphazoline nitrate and methylparaben by sequential injection chromatography.  
*Talanta* 2006, 70 (2), 408-413. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.02.065>  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce, příprava článku, první autor
3. Šatínský, D.; **Chocholouš, P.**; Salabová, M.; Solich, P.  
Simple determination of betamethasone and chloramphenicol in a pharmaceutical preparation using a short monolithic column coupled to a sequential injection system.  
*Journal of Separation Science* 2006, 29 (16), 2494-2499. (IF: **2.415 - Q2**)  
<https://doi.org/10.1002/jssc.200600204>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
4. **Chocholouš, P.**; Holík, P.; Šatínský, D.; Solich, P.  
A novel application of Onyx™ monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography.  
*Talanta* 2007, 72 (2), 854-858. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.009>  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce, příprava článku, první autor
5. **Chocholouš, P.**; Solich, P.; Šatínský, D.  
An overview of sequential injection chromatography.  
*Analytica Chimica Acta* 2007, 600 (1-2 SPEC. ISS.), 129-135. (IF: **5.123 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.02.018>  
**Podíl autora práce:** Příprava přehledového článku, první autor
6. **Chocholouš, P.**; Šatínský, D.; Sladkovský, R.; Pospíšilová, M.; Solich, P.  
Determination of pesticides fenoxycarb and permethrin by sequential injection chromatography using miniaturized monolithic column.  
*Talanta* 2008, 77 (2), 566-570. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.06.015>  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce, příprava článku, první autor

7. Pires, A. R.; Araújo, A. N.; Montenegro, M. C. B. S. M.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.  
New ionophores for vitamin B1 and vitamin B6 potentiometric sensors for multivitaminic control.  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008, 46 (4), 683-691. (IF: **2.831 – Q2/Q2**)  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.12.003>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci
  
8. Lähdesmäki, I.; **Chocholouš, P.**; Carroll, A. D.; Anderson, J.; Rabinovitch, P. S.; Ruzicka, J.  
Two-parameter monitoring in a lab-on-valve manifold, applied to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> measurements.  
*Analyst* 2009, 134 (7), 1498-1504. (IF: **3.864 – Q1**)  
<https://doi.org/10.1039/b822070k>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
  
9. **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, 668 (1), 61-66. (IF: **5.123 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.01.017>  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce, příprava článku, první autor
  
10. Škrlíková, J.; Andruch, V.; Sklenářová, H.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.; Balogh, I. S.  
A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid-liquid extraction. Application for the determination of picric acid.  
*Analytica Chimica Acta* 2010, 666 (1-2), 55-61. (IF: **5.123 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.03.039>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
  
11. Škrlíková, J.; Andruch, V.; Sklenářová, H.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.; Balogh, I. S.  
An air-assisted liquid-liquid extraction using a dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA): Determination of copper.  
*Analytical Methods* 2010, 2 (8), 1134-1139. (IF: **2.073 – Q3/Q2/Q2**)  
<https://doi.org/10.1039/c0ay00211a>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
  
12. **Chocholouš, P.**; Kosařová, L.; Šatínský, D.; Sklenářová, H.; Solich, P.  
Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography - Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column.  
*Talanta* 2011, 85 (2), 1129-1134. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.05.027>  
**Podíl autora práce:** provedení experimentální práce, příprava článku, první autor
  
13. Koblová, P.; Sklenářová, H.; **Chocholouš, P.**; Polásek, M.; Solich, P.  
Simple automated generation of gradient elution conditions in sequential injection chromatography using monolithic column.  
*Talanta* 2011, 84 (5), 1273-1277. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.029>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku



14. Sklenářová, H.; Koblová, P.; **Chocholouš, P.**; Šatínský, D.; Krčmová, L.; Kašparová, M.; Solichová, D.; Solich, P.  
Separation of vitamins retinol acetate, ergocalciferol, or cholecalciferol and tocopherol acetate using sequential injection chromatography.  
*Analytical Letters* 2011, 44 (1-3), 446-456. (IF: **1.206 – Q3**)  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2010.500784>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
15. Lešková, M.; Sklenářová, H.; Bazel, Y.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.; Andruch, V.  
A non-extractive sequential injection method for determination of molybdenum.  
*Talanta* 2012, 96, 185-189. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.01.040>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
16. **Chocholouš, P.**; Vacková, J.; Šrámková, I.; Šatínský, D.; Solich, P.  
Advantages of core-shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids.  
*Talanta* 2013, 103, 221-227. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.036>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, první autor
17. Sklenářová, H.; **Chocholouš, P.**; Koblová, P.; Zahálka, L.; Šatínský, D.; Matysová, L.; Solich, P.  
High-resolution monolithic columns - A new tool for effective and quick separation.  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, 405 (7), 2255-2263. (IF: **3.307 – Q2/Q1**)  
<https://doi.org/10.1007/s00216-012-6561-y>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku, korespondující autor
18. Šatínský, D.; Brabcová, I.; Maroušková, A.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.  
Green chromatography separation of analytes of greatly differing properties using a polyethylene glycol stationary phase and a low-toxic water-based mobile phase.  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2013, 405 (18), 6105-6115. (IF: **3.307 – Q2/Q1**)  
<https://doi.org/10.1007/s00216-013-7003-1>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
19. Šatínský, D.; **Chocholouš, P.**; Válová, O.; Hanusová, L.; Solich, P.  
Two-column sequential injection chromatography for fast isocratic separation of two analytes of greatly differing chemical properties.  
*Talanta* 2013, 114, 311-317. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.055>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
20. Šatínský, D.; Kameníčková, D.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.  
Fast HPLC method for determination of fenoxycarb and permethrin in antiparasitic veterinary shampoo using fused-core column.  
*Chromatographia* 2013, 76 (21-22), 1559-1564. (IF: **1.401 – Q4/Q3**)  
<https://doi.org/10.1007/s10337-013-2464-0>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku

21. Acebal, C. C.; Grünhut, M.; Šrámková, I.; **Chocholouš, P.**; Lista, A. G.; Sklenářová, H.; Solich, P.; Band, B. S. F.  
Application of a fully integrated photodegradation-detection flow-batch analysis system with an on-line preconcentration step for the determination of metsulfuron methyl in water samples.  
*Talanta* 2014, *129*, 233-240. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.05.024>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
22. Nováková, L.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.  
Ultra-fast separation of estrogen steroids using subcritical fluid chromatography on sub-2-micron particles.  
*Talanta* 2014, *121*, 178-186. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.056>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
23. Batista, A. D.; **Chocholouš, P.**; Šatínský, D.; Solich, P.; Rocha, F. R. P.  
On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography.  
*Talanta* 2015, *133*, 142-149. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.07.056>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, korespondující autor
24. Horstkotte, B.; Jarošová, P.; **Chocholouš, P.**; Sklenářová, H.; Solich, P.  
Sequential injection chromatography with post-column reaction/derivatization for the determination of transition metal cations in natural water samples.  
*Talanta* 2015, *136*, 75-83. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.01.001>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
25. Sklenářová, H.; Fialová, B.; Šandrejová, J.; **Chocholouš, P.**; Solich, P.  
An automated method for monitoring aluminum in water samples based on a sequential injection platform.  
*Analytical Methods* 2015, *7* (13), 5530-5537. (IF: **2.073 – Q3/Q2/Q2**)  
<https://doi.org/10.1039/c5ay01176k>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
26. Šrámková, I.; **Chocholouš, P.**; Sklenářová, H.; Šatínský, D.  
On-line coupling of Micro-Extraction by Packed Sorbent with Sequential Injection Chromatography system for direct extraction and determination of betaxolol in human urine.  
*Talanta* 2015, *143*, 132-137. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.05.048>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
27. Grand, M. M.; **Chocholouš, P.**; Růžička, J.; Solich, P.; Measures, C. I.  
Determination of trace zinc in seawater by coupling solid phase extraction and fluorescence detection in the Lab-On-Valve format.  
*Analytica Chimica Acta* 2016, *923*, 45-54. (IF: **5.123 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.03.056>  
**Podíl autora práce:** experimentální práce, účast na přípravě článku

28. Havlíková, L.; Parmová, M.; **Chocholeouš, P.**; Solich, P.  
Sensitive Monitoring of Amygdalin and 5-Hydroxytryptamine in Food Supplements Using HILIC OH5 Chromatography.  
*Food Analytical Methods* 2016, 9 (6), 1849-1856. (IF: **2.245 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1007/s12161-015-0362-9>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
29. Horstkotte, B.; **Chocholeouš, P.**; Solich, P.  
Large volume preconcentration and determination of nanomolar concentrations of iron in seawater using a renewable cellulose 8-hydroquinoline sorbent microcolumn and universal approach of post-column eluate utilization in a Lab-on-Valve system.  
*Talanta* 2016, 150, 213-223. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.044>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku
30. Davletbaeva, P.; **Chocholeouš, P.**; Bulatov, A.; Šatínský, D.; Solich, P.  
Sub-1 min separation in sequential injection chromatography for determination of synthetic water-soluble dyes in pharmaceutical formulation.  
*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2017, 143, 123-129. (IF: **2.831 – Q2/Q2**)  
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.05.036>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, korespondující autor
31. Havlíková, L. C.; Urbanová, M.; **Chocholeouš, P.**; Solich, P.  
Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger.  
*Food Analytical Methods* 2017, 10 (4), 1016-1023. (IF: **2.245 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0662-8>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
32. **Chocholeouš, P.**; Dědková, L.; Boháčová, T.; Šatínský, D.; Solich, P.  
Fast separation of red colorants in beverages using cyano monolithic column in Sequential Injection Chromatography.  
*Microchemical Journal* 2017, 130, 384-389. (IF: **2.746 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.022>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, korespondující autor
33. **Chocholeouš, P.**; Gil, R.; Acebal, C. C.; Kubala, V.; Šatínský, D.; Solich, P.  
Multilayered particle-packed column: Evaluation and comparison with monolithic and core-shell particle columns for the determination of red azo dyes in Sequential Injection Chromatography.  
*Journal of Separation Science* 2017, 40 (6), 1225-1233. (IF: **2.415 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1002/jssc.201601224>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, první autor
34. **Chocholeouš, P.**; Wiczorek, M.; Świt, P.; Kozak, J.; Solich, P.; Kościelniak, P.  
Novel Approach to Two-Component Analysis Based on the Generalized Calibration Strategy.  
*Analytical Letters* 2017, 50 (4), 617-628. (IF: **1.206 – Q3**)  
<https://doi.org/10.1080/00032719.2016.1194425>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, příprava článku, první autor

35. Sklenářová, H.; Voráčová, I.; **Chocholouš, P.**; Polášek, M.  
Quantum dots as chemiluminescence enhancers tested by sequential injection technique: Comparison of flow and flow-batch conditions.  
*Journal of Luminescence* 2017, *184*, 235-241. (IF: **2.732 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2016.12.030>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
36. Háková, M.; Raabová, H.; Havlíková, L. C.; **Chocholouš, P.**; Chvojka, J.; Šatínský, D.  
Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent.  
*Talanta* 2018, *181*, 326-332. (IF: **4.244 - Q1**)  
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.043>  
**Podíl autora práce:** konzultace během experimentální práce, účast na přípravě článku
37. Sklenářová, H.; Bílková, A.; Pechová, M.; **Chocholouš, P.**  
Determination of major phenolic compounds in apples: Part I—Optimization of high-performance liquid chromatography separation with diode array detection.  
*Journal of Separation Science* 2018, *41* (15), 3042-3050. (IF: **2.415 – Q2**)  
<https://doi.org/10.1002/jssc.201800302>  
**Podíl autora práce:**
38. Novosvětská, L.; **Chocholouš, P.**; Švec, F.; Sklenářová, H.  
Fully automated method based on on-line molecularly imprinted polymer solid-phase extraction for determination of lovastatin in dietary supplements containing red yeast rice.  
*Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2019. přijato, v tisku (IF: **3.307 – Q2/Q1**)  
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1554-0>  
**Podíl autora práce:** účast na experimentální práci, účast na přípravě článku