

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

# **Automatizace extrakce sulfamerazinu s využitím LOV techniky**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Warunya Boonjob, Ph.D.

Konzultant: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D

Hradec Králové 2015

Lucia Kováčová

Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci sú riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

V Hradci Králové:

Touto cestou chcem poďakovať vedúcej mojej diplomovej práce Warunyi Boonjob, Ph.D., konzultantke Doc. PharmDr. Hane Sklenářovej, Ph.D. za ich ochotu, rady a trpezlivosť. Ďakujem aj rodine za ich podporu pri štúdiu.

# Abstrakt

Univerzita Karlova v Prahe

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytickej chémie

Kandidát: Lucia Kováčová

Školiteľ: Warunya Boonjob, Ph.D.

Konzultant: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Automatizace extrakce sulfamerazínu s využitím LOV techniky

Táto práca sa zaoberá vývojom metódy pre stanovenie sulfamerazínu v sére pomocou LOV metodiky. Analyt bol zakoncentrovaný na sorbente Oasis-HLB. Ako elučné činidlo bol použitý čistý methanol. K detekcii bola použitá UV spektrofotometria pri vlnovej dĺžke 275 nm. Boli nájdené optimálne podmienky pre automatizáciu v systéme SIA. Bola optimalizovaná tvorba kolonky, objem vzorky, rýchlosť aspirácie vzorky na kolonku, rýchlosť elúcie. Bola premeraná kalibračná závislosť s korelačným koeficientom 0,99950 v rozsahu koncentrácií 50 – 1000 ppb. Bol vypočítaný limit detekcie (LOD = 71,70  $\mu\text{g/L}$ ) a limit kvantifikácie (LOQ = 238,99  $\mu\text{g/L}$ ). Premerala sa opakovateľnosť pre koncentrácie 500 ppb a 1000 ppb s relatívnymi smerodajnými odchýlkami (RSD) 5,66% a 6,60%.

# Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Lucia Kováčová

Supervisor: Warunya Boonjob, Ph.D.

Consultant: Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.

Title of diploma work: Automation of sulfamerazine extraction using LOV technique

This thesis deals with development of the method to determine sulfamerazine in spiked serum using the LOV methodology. The analyte was preconcentrated on sorbent Oasis-HLB. Pure methanol was used as eluent. UV spectrophotometry with wavelength 275 nm was used as detection technique. The optimal conditions of measurement in SIA system were specified – the creation of microcolumn, the volume of analyte, the analyte aspiration and elution flowrates. The linear calibration curve was found with the correlation coefficient of 0.99950 in the concentration range of 50 – 1000 ppb. The limit of detection (LOD = 71.70 µg/L) and the limit of quantification (LOQ = 238.99 µg/L) were defined. The repeatability for concentrations of 500 ppb and 1000 ppb were measured. The relative standard deviations (RSDs) were 5.66% and 6.60%, respectively.

# Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah .....	6
Zoznam skratiek.....	8
1. Úvod.....	9
2. Cieľ a popis zadania práce .....	10
3. Teoretická časť .....	11
3.1. Sekvenčná injekčná analýza.....	11
3.1.1. Schematické znázornenie a princíp SIA.....	11
3.1.2. Lab-on-valve usporiadanie .....	14
3.1.2.1. UV-VIS spektrofotometrická detekcia .....	15
3.1.3. „Bead injection“ technika.....	16
3.1.3.1. Extrakcia na tuhej fáze.....	19
3.1.3.2. Extrakcia na tuhej fáze v SI-BI-LOV systéme .....	20
3.2. Sufamerazín.....	22
3.2.1. Vlastnosti .....	22
3.2.2. Stanovenie sulfamerazínu.....	23
3.2.2.1. Liekopisná metóda.....	23
3.2.2.2. Publikované štúdie súvisiace so stanovením sulfamerazínu.....	23
4. Experimentálna časť .....	25
4.1. Materiál .....	25
4.1.1. Chemikálie.....	25
4.1.2. Prístroje a software .....	25
4.2. Pracovný postup .....	26
4.2.1. Príprava roztokov .....	26
4.2.1.1. Zásobné roztoky.....	26
4.2.1.2. Kalibračné roztoky.....	26
4.2.2. Výber postupu využitia sorbentu.....	27
4.2.3. Optimalizácia LOV systému .....	27
4.2.3.1. Optimalizácia tvorby kolonky .....	28

4.2.3.2. Optimalizácia rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku.....	28
4.2.3.3. Optimalizácia objemu vzorky.....	28
4.2.3.5. Kalibračná závislosť .....	29
4.2.3.6. Opakovateľnosť .....	29
4.2.3.7. Analýza reálnej vzorky .....	30
5. Výsledky a diskusia .....	31
5.1. Výber postupu využitia sorbentu .....	31
5.2. Optimalizácia LOV systému .....	31
5.2.1. Optimalizácia tvorby kolonky .....	31
5.2.2. Optimalizácia rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku .....	33
5.2.3. Optimalizácia objemu vzorky.....	34
5.2.4. Optimalizácia rýchlosti elúcie .....	35
5.2.5. Výsledný program .....	37
5.2.6. Kalibračná závislosť .....	40
5.2.7. Opakovateľnosť .....	41
5.2.8. Analýza reálnej vzorky.....	43
6. Súhrn.....	44
7. Záver .....	46
8. Zoznam literatúry.....	47
Zoznam tabuliek .....	52
Zoznam obrázkov .....	53

# Zoznam skratiek

<b>BI</b>	„bead injection“ technika (bead injection)
<b>ETAAS</b>	elektrotermálna atómová absorpčná spektrometria (electrothermal atomic absorption spectrometry)
<b>FIA</b>	prietoková injekčná analýza (flow injection analysis)
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kvapalinová chromatografia (high-performance liquid chromatography)
<b>LOD</b>	limit detekcie (limit of detection)
<b>LOQ</b>	limit kvantifikácie (limit of quantification)
<b>LOV</b>	„lab-on-valve“ usporiadanie (lab-on-valve)
<b>μSI LOV</b>	mikro sekvenčná injekčná analýza v „lab-on-valve“ usporiadaní
<b>PEEK</b>	polyéteréterketón
<b>RSD</b>	relatívna smerodajná odchýlka (relative standard deviation)
<b>SD</b>	smerodajná odchýlka (standard deviation)
<b>SIA</b>	sekvenčná injekčná analýza (sequential injection analysis)
<b>SIC</b>	sekvenčná injekčná chromatografia (sequential injection chromatography)
<b>SPE</b>	extrakcia na tuhej fáze (solid phase extraction)
<b>UV</b>	ultrafialové žiarenie (ultraviolet radiation)
<b>VIS</b>	viditeľné žiarenie (visible radiation)



# 1. Úvod

Sekvenčná injekčná analýza je modernou prietokovou neseparačnou metódou, ktorá je úplne automatizovaná a umožňuje automatizáciu rôznych extrakčných postupov pre prípravu vzorky a jej on-line analýzu. Zavedenie „lab-on-valve“ techniky umožnilo zjednodušenie, miniaturizáciu, zrýchlenie a zvýšenie spoľahlivosti extrakčnej metódy uplatnenej pre stanovenie sulfamerazínu.

„Bead injection“ je technika zabezpečujúca využitie suspenzie častíc k vytvoreniu extrakčnej kolonky priamo v prietokovom systéme.

Táto práca bola zameraná na využitie uvedených metód pre stanovenie sulfamerazínu, čo je látka s antimikróbnou aktivitou.

## 2. Cieľ a popis zadania práce

Cieľom tejto diplomovej práce bolo optimalizovať metódu pre stanovenie sulfamerazínu s využitím extrakcie na tuhej fáze a automatizovať ju v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy pomocou LOV techniky s UV detekciou. Úlohou bolo vybrať postup použitia sorbentu, optimalizovať parametre merania ako: tvorbu kolonky, objem vzorky, rýchlosť aspirácie vzorky na kolonku a rýchlosť elúcie analytu, výber elučného rozpúšťadla. Ďalej zmerať kalibračnú závislosť, vyjadriť limit detekcie, limit kvantifikácie a overiť opakovateľnosť merania. Na záver bolo úlohou overiť funkčnosť metódy na reálnej vzorke.

## 3. Teoretická časť

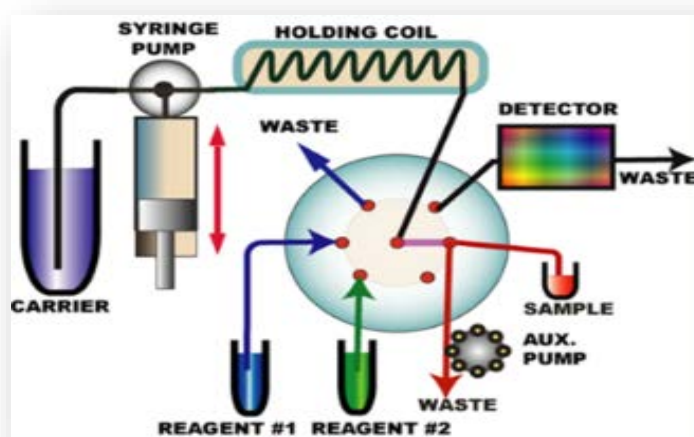
### 3.1. Sekvenčná injekčná analýza

#### 3.1.1. Schematické znázornenie a princíp SIA

Sekvenčná injekčná analýza (SIA) je druhou generáciou neseparačných prietokových analytických metód. Prvýkrát ju prezentovali Růžička a Marshall. SIA umožňuje plnú automatizáciu a on-line analýzu vzorky [1,3].

SIA je založená na obojsmernom programovateľnom nesúvislom toku (flow), ktorý je ovládaný počítačom. Základnými súčasťami SIA systému sú:

- piestové čerpadlo (syringe pump)
- miešacia cievka (holding coil)
- viaccestný selekčný ventil (multiposition selection valve)
- detektor (detector)
- počítač



Obrázok 1: Schematické znázornenie systému SIA [3]

carrier- nosný prúd

holding coil- miešacia cievka

sample- vzorka

waste- odpad

detector- detektor

reagent- činidlo

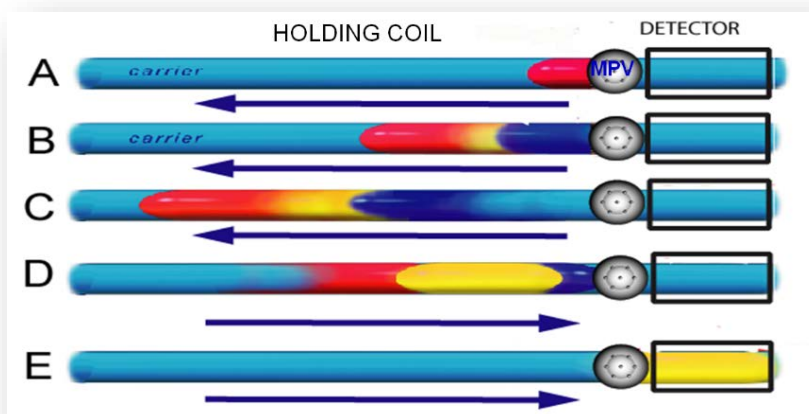
syringe pump- piestové čerpadlo

aux. pump- prídavné čerpadlo

Univerzálnosť sekvenčnej injekčnej analýzy je zabezpečená prítomnosťou viaccestného selekčného ventilu. Každý port tohto ventilu slúži k inému účelu a usporiadanie jednotlivých reagensí, vzorky a detektoru sa dá jednoducho meniť tak, aby vyhovovalo potrebám danej analýzy [2, 3].

SIA systém pracuje v cykle naprogramovaných pohybov čerpadla, ktoré sú synchronizované s prepínaním selekčného ventilu k jednotlivým portom. Do miešacej cievky, spojenej s hlavným portom viaccestného selekčného ventilu, sú postupne zo zásobníkov, spojených s jednotlivými portami ventilu, aspirované presné objemy vzorky a reagensí. Následne zmenou smeru pohybu piestového čerpadla dôjde k obráteniu prúdu kvapaliny, zóny vzorky a činidla sa premiešajú a vzniknutá zóna produktu je eluovaná do detektoru. Na konci meracieho cyklu je systém premytý nosným prúdom do odpadu.

Rýchlosť jednotlivých krokov metódy sa mení úpravou rýchlosti pohybu piestového čerpadla. Zmena smeru jeho pohybu zabezpečuje buď priamy alebo spätný tok [1, 4, 5]. Princíp zmeny smeru toku v SIA je zhrnutý na Obrázku 2.



**Obrázok 2: Princíp zmeny smeru toku v SIA [3]**

carrier- nosný prúd

detector- detektor

žltá zóna- produkt

holding coil- miešacia cievka

MPV- viaccestný selekčný ventil

modrá zóna- činidlo

červená zóna- vzorka

Zastavením toku je predĺžená doba reakcie vzorky a činidla. Týmto krokom sa zvýši citlivosť daného stanovenia. Tok môže byť zastavený v miešacej cievke alebo v prietokovej cele.

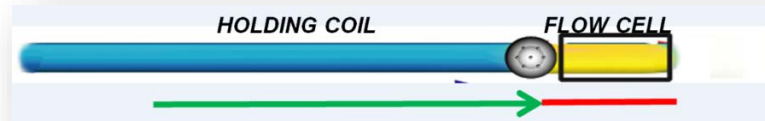
- Pri zastavení toku v **miešacej cievke** a následnej detekcii, dáva detektor signál vo forme píku (peak). Jeho výška je úmerná koncentrácii stanovovaného analytu (Obrázok 3).



**Obrázok 3: Zastavenie toku v miešacej cievke [3]**

Červená časť šípky- zastavenie toku      Zelená časť šípky- spustenie toku

- Pri zastavení toku, keď sa vzorka nachádza v **prietokovej cele**, je priebeh reakcie monitorovaný v reálnom čase (Obrázok 4). Odozva detektoru je vo forme rýchlostnej krivky reakcie (reaction rate curve), ktorej smernica je úmerná koncentrácii analytu [1, 3].



**Obrázok 4: Zastavenie toku v prietokovej cele [3]**

Červená časť šípky- zastavenie toku      Zelená časť šípky- spustenie toku

K detekcii v sekvenčnej injekčnej analýze sa využívajú spektrofotometrické, fluorescenčné alebo elektrochemické detektory, pričom voľba konkrétneho typu detektoru závisí na druhu použitej analytickej reakcie [3,4].

Celý proces analýzy, ako aj zber, spracovanie a ukladanie dát je riadený počítačom vybaveným príslušným softwarom.

Aspirácia vzorky a reagensí a následná detekcia analytu prebieha vždy v presne stanovených časových intervaloch, čím je zabezpečené rovnaké spracovanie každej vzorky. Sekvenčná injekčná analýza umožňuje porovnávanie štandardu s neznámou látkou [1, 3, 4].

### 3.1.2. Lab-on-valve usporiadanie

V snahe miniaturizovať systém SIA bol vyvinutý mikroSI „lab-on-valve“ formát ( $\mu$ SI LOV). LOV systém používa malé objemy vzorky a reagensí a umožňuje zvýšenie rýchlosti analýzy [3].

Jedná sa o priehľadnú, jednoliatu štruktúru umiestnenú na selekčnom ventile (z toho pochádza aj názov „lab-on-a-valve“, čo v preklade znamená laboratórium na ventile). Systém je navrhnutý tak, aby bola vzdialenosť medzi nástrekom vzorky a detektorom čo najkratšia. V LOV jednotke sú začlenené jednotlivé komponenty ako prietoková cela monitorovaná optickými vláknami, spojovací kanálik, porty, konektory.

LOV jednotka bola pôvodne zhotovená z polymethylmetakrylátu, dnes sa skôr používajú tvrdý polyvinylchlorid (Perspex), polyéteréterketón (PEEK) alebo polyéterimid (ULTEM) kvôli lepšej odolnosti voči organickým rozpúšťadlám [3,6,7].

Cez miešaciu cievku je centrálny port (central port) prepojený s piestovou pumpou. Centrálny port sa pomocou vnútorného rotora v selekčnom ventile otáča k jednotlivým portom LOV jednotky. Dochádza k prepojeniu portu s pumpou a je umožnená aspirácia alebo disperzia [6].



Obrázok 5 : SIA- LOV formát [8]

LOV formát sa vyznačuje univerzálnosťou a jednoducho sa dá prispôbiť danej analýze. Toto usporiadanie je veľmi ekonomické, umožňuje zníženie objemu vzorky a činidiel. Na jednu analýzu sa obvykle použije 10 – 20  $\mu\text{L}$  vzorky a chemický odpad obvykle činí približne 0,1 – 0,2 mL [9].

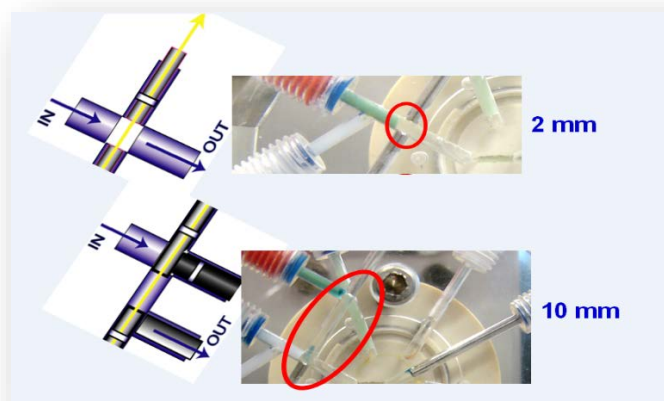
K detekcii sa v LOV môže použiť niekoľko typov detektorov. Najčastejšie sa využíva detekcia spektrofotometrická alebo fluorescenčná. Tiež sa dajú použiť chemiluminiscenčné, voltametrické alebo konduktometrické detektory [10].

### **3.1.2.1. UV-VIS spektrofotometrická detekcia**

Spektrofotometria v ultrafialovej (UV) a viditeľnej (VIS) oblasti je založená na absorpcii elektromagnetického žiarenia vzorkou v závislosti na vlnovej dĺžke dopadajúceho žiarenia. Pri dopade elektromagnetického žiarenia elektróny prechádzajú do vyšších energetických hladín. Tejto excitácii podliehajú predovšetkým  $\pi$  elektróny. Oblasť vlnových dĺžok 200 – 400 nm zodpovedá UV oblasti spektra a viditeľnej oblasti odpovedajú vlnové dĺžky 400 – 760 nm. V týchto oblastiach absorbujú molekuly, ktoré vo svojej štruktúre obsahujú skupiny s dvojnými alebo trojnými väzbami, tzv. chromofóry. Vo VIS oblasti absorbujú molekuly s prítomnosťou viacerých konjugovaných väzieb [20].

UV-VIS detekcia je často využívaná v prietokových metódach. On-line meranie absorbancie v LOV systéme je umožnené vďaka prítomnosti prietokovej cely, ktorá je priamo prepojená s optickými vláknami. Tie komunikujú s externým zdrojom svetla (napr. LED alebo deutériová lampa) a detektorom (napr. OceanOptics spektrofotometer) [10, 11].

V tejto konfigurácii sú optické vlákna umiestnené oproti sebe, lúč svetla smeruje priamo cez prietokovú celu. Dĺžku cesty svetelného lúča cez prietokovú celu môžeme upraviť zmenou polohy optických vlákien. Môže byť krátka (1 – 2 mm), štandardná (do 10 mm), alebo pri použití modulu na predĺženie cely môže dosiahnuť až 50 cm. Priemer optických vlákien je o 30 mikrónov menší, než je priemer LOV kanálikov. Tým je umožnené voľné pretekanie kvapalín okolo optických vlákien [3,10]. Na Obrázku 6 je znázornená krátka a štandardná dĺžka cesty svetelného lúča cez prietokovú celu.



Obrázok 6 : Cesta svetelného lúča cez prietokovú celou [3]

### 3.1.3. „Bead injection“ technika

„Bead injection“ technika (BI) je treťou generáciou prietokových metód. BI technika môže byť používaná v konfigurácii  $\mu$ SI chromatografie alebo BI spektroskopie [12].

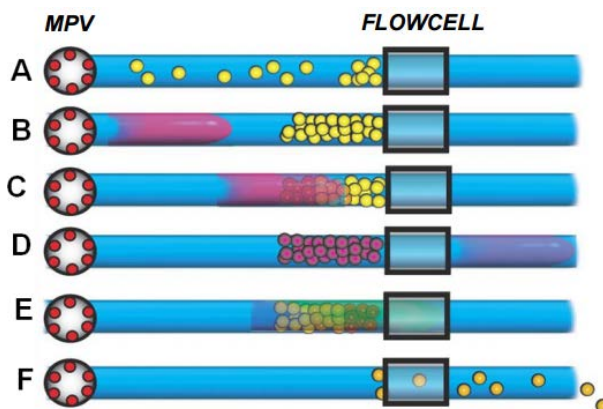
Malý objem suspenzie mikročastíc (bead suspension) je nastrieknutý do nosného prúdu. Mikročastice (beads) sú zastavené v mikrokanálikoch (pomocou zátek alebo optických vlákien) na určitom mieste LOV formátu a tvoria stĺpec. Pri prietoku vzorky mikrokolonkou reagujú zložky vzorky s funkčnými skupinami povrchu mikročastíc a zachytávajú sa na nich. Následne sú zbytky matrice vymyté, zachytené molekuly sú eluované a detekované buď priamo, alebo po pridaní vhodného činidla. Mikrokolonka je odstránená do odpadu pôsobením spätného toku [3].

- Pri  **$\mu$ SI chromatografii** je vzorka aplikovaná na mikrokolonku nachádzajúcu sa pred prietokovou celou. Analyt sa zachytáva na mikročasticiach, matrica a nezachytené molekuly vzorky sú vymyté. Pri aplikácii elučného činidla je analyt desorbovaný, eluovaný a detekovaný v prietokovej cele [12].
- Metóda **BI spektroskopie** sa odlišuje v tom, že mikrokolonka sa tvorí priamo v prietokovej cele. Mikročastice sú zadržané zátkou, ktorá však umožňuje voľný pohyb kvapalín. Vzorka prechádza prietokovou celou, analyt sa zachytáva na mikročasticiach a je priamo na nich detekovaný (svetelný lúč prechádza priamo



cez mikrokolonku do detektoru). Nakoniec sa aplikuje elučné činidlo, ktorým je analyt z mikročastíc eluovaný. Pokiaľ nedochádza k úplnej desorpcii analytu z mikročastíc signál nedosiahne základnú líniu [3, 12].

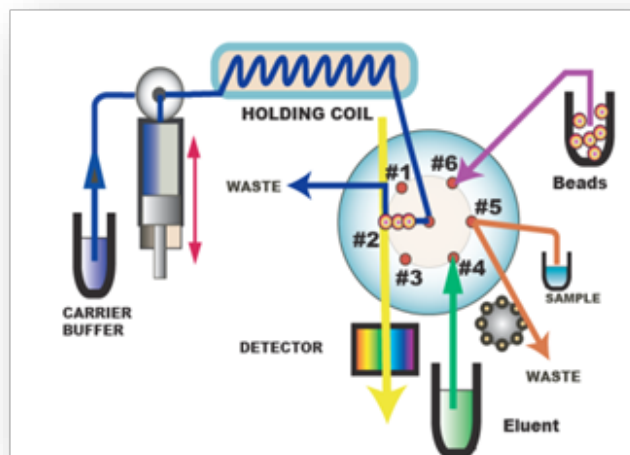
Na Obrázku 7 je znázornený princíp „bead injection“ techniky v konfigurácii  $\mu$ SI chromatografie.



**Obrázok 7 : Princíp „bead injection“ techniky v konfigurácii  $\mu$ SI chromatografie [12]**

Hlavnou výhodou je akumulácia analytu na povrchu mikročastíc, pričom interferujúca matrica vzorky je odstránená. Dochádza k zvýšeniu citlivosti stanovenia a znižuje sa limit detekcie. Výhodou je tiež obnoviteľnosť mikrokolonky za použitia malého množstva sorbentu [3, 11].

Potenciálnym problémom môže byť usadzovanie mikročastíc v hadičkách, čím dôjde k ich upchávaniu. Pôsobením vyšších prietokových rýchlostí by sa mohla zvyšovať hustota mikrokolonky, zvyšovala by sa jej kompaktnosť a ťažšie by sa odstraňovala. Pri prietoku cez mikrokolonku je nutné používať nižšie prietokové rýchlosti [3]. Schematicky je SIA-LOV systém pre „bead injection“ techniku znázornený na Obrázku 8.



**Obrázok 8 : Schematické znázornenie SIA-LOV systému pre „bead injection“ techniku [3]**

carrier buffer- nosný prúd pufru  
 detector- detektor  
 eluent- elučné činidlo

holding coil- miešacia cievka  
 beads- mikročastice

sample- vzorka  
 waste- odpad

Kritickými parametrami používaných mikročastíc sú veľkosť, tvar a materiál, z ktorého sú vyrobené. Mikročastice musia mať sférický tvar a veľkosť v rozmedzí 20 – 150  $\mu\text{m}$ . Najčastejšie sa používajú polymérne mikročastice (Sphadex, Sepharose) dostupné s veľkým množstvom funkčných skupín umožňujúcich široké využitie. Sphadex je vyrobený z krížom prepojených (cross-linked) mikrobiálnych polysacharidov, Sepharose z krížom prepojených (cross-linked) čistených polysacharidov získaných z morských rias.

Ligandy viazané na povrchu mikročastíc umožňujú extrakciu na základe afinity (extrakciu kationov, aniónov), nepolárnych látok, ale aj biomolekúl (napr. protilátok, proteínov, nukleových kyselín). Analyt je selektívne adsorbovaný na mikrokolonku, matrica vzorky sa vymýva a následne je analyt pôsobením vhodného elučného činidla desorbovaný a je umožnené jeho stanovenie [3].

Aplikácia „bead injection“ techniky je široká. Používa sa napríklad k extrakcii stôp kovov, hormónov, proteínov a bunkových metabolitov. „Bead injection“ technika využíva veľmi malý objem vzorky a reagentov, je ekonomická a znižuje množstvo

produkovaného chemického odpadu. Výberom vhodného typu sorbentu a detekčnej techniky sa dá metóda jednoducho aplikovať na rôzne analytické stanovenia [3, 9].

### **3.1.3.1. Extrakcia na tuhej fáze**

V analýze (priemyselnej, enviromentálnej, biologickej alebo biotechnologickej) sa často používajú vzorky s komplexnou maticou, ktorá môže ovplyvňovať stanovenie. Mnohokrát je koncentrácia stanovovanej látky veľmi nízka. Z uvedeného vyplýva problém pri priamej detekcii. K odstráneniu týchto problémov sa využívajú rôzne techniky úpravy vzorku. Jednou z nich je aj extrakcia na tuhej fáze (SPE) [21].

SPE (solid phase extraction) je metóda používaná na prípravu vzorky pred vlastným stanovením (sample-pretreatment). SPE umožňuje odstránenie matrice vzorky, ktorá interferuje pri stanovení a zároveň prekoncentráciu analytu, čím sa zvyšuje citlivosť stanovenia.

Pri SPE sa analyt z kvapalnej matrice vzorky izoluje na povrchu tuhých častíc sorbentu. Analyt je na nich viazaný po celú dobu spracovania vzorky. Pred detekciou je uvoľnený pôsobením vhodného elučného činidla.

Typicky sa príprava vzorky pomocou SPE skladá zo štyroch krokov: prípravy sorbentu (conditioning), aplikácie vzorky (sample loading), premytia (washing) a elúcie (elution).

Najskôr sa funkčné skupiny sorbentu aktivujú vhodným rozpúšťadlom a následne sa sorbent premyje vodou. Cez takto aktivovaný sorbent sa nechá pretekať vzorka. Analyt sa viaže na povrchu sorbentu. Po skončení aplikácie vzorky je zbytok matrice odstránený premytím sorbentu kvapalinou. Nakoniec je analyt kvantitatívne eluovaný pôsobením vhodného elučného rozpúšťadla [11, 13, 14].

Viazanie analytu na povrchu častíc sorbentu prebieha na základe rôznych interakcií. Vyskytujú sa polárne interakcie (interakcie dipól-dipól), nepolárne interakcie (Van der Waalsove sily), vodíkové väzby alebo elektrostatické interakcie (interakcie kation-anión). Na základe hydrofóbných, polárnych alebo ionogénnych vlastností analytu je potrebné vybrať vhodný typ sorbentu [13].

### 3.1.3.2. Extrakcia na tuhej fáze v SI-BI-LOV systéme

Extrakcia na tuhej fáze sa v prietokových metódach používa často ako metóda pre on-line úpravu vzorky. Obvykle sa kolonka tvorená sorbentom považuje za stálu súčasť prietokového systému (permanent packed-column). Pre jednotlivé cykly aspirácie vzorky a elúcie analytu sa kolonka používa opakovane. Odstránená a znova naplnená je až po dlhšom používaní. Pri dlhšie trvajúcich analýzach to môže spôsobiť problémy. Ako napríklad to, že mikrokolonka sa stáva pevnejšia, zvyšuje sa hustota jej naplnenia a zmenšujú sa voľné priestory medzi časticami. V dôsledku toho vzniká v systéme často vysoký spätný tlak. Niekedy môže dokonca dôjsť k ireverzibilnej zmene sorbentu (kontaminácii, inaktivácii, prípadne strate funkčných skupín) [11, 15].

V snahe predísť týmto problémom bola predstavená v systéme SIA technika „bead injection“. Tá umožňuje obnovenie mikrokolonky pre SPE po každom meraní, ak je to potrebné. Aplikáciou BI techniky do systému sekvenčnej injekčnej analýzy bola vyvinutá jednoduchá, robustná, spoľahlivá on-line metóda prekoncentrácie analytu [21].

BI technika použitá v LOV formáte pre vytvorenie mikrokolonky priamo v LOV jednotke, je pokrokom k automatizácii a miniaturizácii SPE. Mikrokolonka je tvorená *in situ* aspiráciou presného objemu suspenzie mikročastíc (beads), ktoré sú automaticky transportované na požadované miesto LOV jednotky. V dutine kanálíku sú zachytené pomocou PEEK hadičky, polyetylénovej frity alebo optických vlákien. Zabezpečujú voľné pretekание kvapaliny, zatiaľ čo mikročastice zostávajú na svojom mieste a formujú mikrokolonku. Mikrokolonka môže byť vytvorená priamo v prietokovej cele alebo v mikroductine spojovacieho kanálíku. [11].

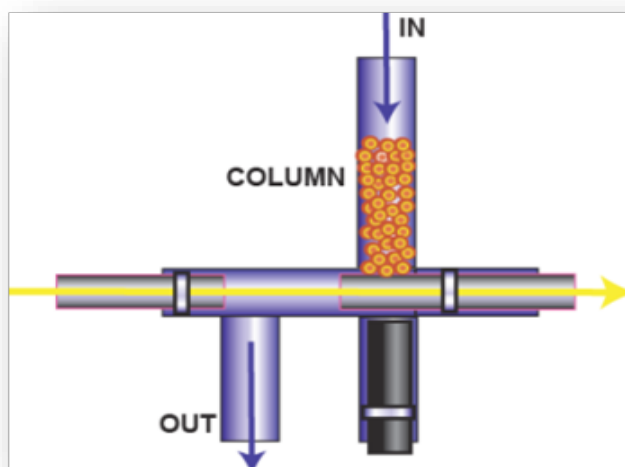
Analýza pomocou SI-BI-LOV-SPE metódy pozostáva z týchto základných krokov:

- **tvorba mikrokolonky** (bead packing)
- **aktivácia povrchu mikročastíc** (bead conditioning), kedy sa cez kolonku nechá pretiecť organické rozpúšťadlo a následne rovnaké množstvo vody
- **aplikácia vzorky na mikrokolonku** (sample loading), analyt sa zachytáva na povrchu mikročastíc
- **premytie mikrokolonky** (washing step), ktorej účelom je odstránenie interferujúcej matrice vzorky

- **elúcia** (elution) malým množstvom organického rozpúšťadla [13].

Analyt je na povrchu mikročastíc zachytený buď priamo interakciou s ich funkčnými skupinami alebo po on-line premene analytu na vhodnú formu schopnú tejto interakcie.

Detekcia analytu môže prebiehať priamo na povrchu mikročastíc bez potreby jeho elúcie, za využitia postupu BI spektroskopie. Ďalšou možnosťou detekcie je elúcia analytu z povrchu mikročastíc a transport eluátu do detektoru (Obrázok 9) [11].



**Obrázok 9: Elúcia analytu z mikrokolonky a detekcia v prietokovej cele LOV jednotky [3]**

Column - mikrokolonka

IN- vstup kvapaliny

OUT- výstup kvapaliny

žltá šípka – smer lúča svetla zo zdroja, cez prietokovú celu do detektoru

Ampan et al. predstavili využitie SI-BI-LOV usporiadania pre stanovenie stopového množstva olova. Pre tvorbu obnoviteľnej mikrokolonky v LOV jednotke použili mikročastice Sephadex G-25 impregnované dithizónom. Olovo bolo sorbované na mikročasticiach a stanovené pomocou elektrotermálnej atómovej absorpčnej spektrofotometrie (ETAAS). Limit detekcie bol 0,3 ng a prekoncentračný faktor 39 [16].

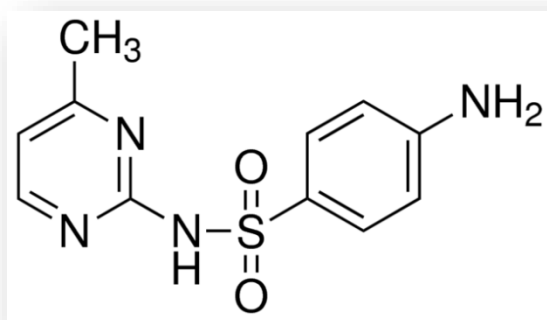
Vidigal, Tóth a Rangel využili SI-LOV-BI-SPE koncept pre stanovenie železa vo vzorkách vína. Pre tvorbu mikrokolonky v prietokovej cele použili NTA Superflow resin mikročastice („cross-linked“ agaróza o rozmere mikročastíc 60-160  $\mu\text{m}$ ). Vzorku aplikovali po častiach a jej aplikácia sa striedala s oxidačným činidlom (peroxid vodíka). Železité ionty, zachytené na mikrokolonke, následne nechali zreagovať s  $\text{SCN}^-$  iontami

za vzniku intenzívne červeného sfarbenia. Detekcia prebiehala spektrofotometricky (BI spektrometria) pri vlnovej dĺžke 480 nm. Na konci každého stanovenia bola mikrokolonka zo systému odstránená. Takto stanovili železité ióny s limitom detekcie 0,02 mg/L v lineárnom rozmedzí 0,09 – 5 mg/L [17].

## 3.2. Sufamerazín

### 3.2.1. Vlastnosti

Systematický názov sulfamerazínu je 4-amino-*N*-(4-methylpyrimidin-2-yl)benzen-1-sulfonamid. Vzorec sulfamerazínu je uvedený na Obrázku 10 [18].



**Obrázok 10: Vzorec sulfamerazínu [19]**

Je to biely, žltavo biely alebo naružovelo biely kryštalický prášok, ktorý sa veľmi ťažko rozpúšťa vo vode a je minimálne rozpustný v acetóne. Uchováva sa chránený pred svetlom [18].

Sulfamerazín je antibakteriálne chemoterapeutikum patriace do skupiny sulfonamidov. Ich účinok je založený na kompetícii s *para*-aminobenzoovou kyselinou (PABA), čím následne inhibujú syntézu kyseliny listovej a dochádza k poruchám delenia buniek. V humánnej medicíne je sulfamerazín už obsolentné liečivo. Využitie však nachádza vo veterinárnej medicíne na liečbu bakteriálnych infekcií a kokcidióz. Sulfamerazín sa používa buď samotný alebo v kombinácii s inými antibiotikami. [22, 23].

## 3.2.2. Stanovenie sulfamerazínu

### 3.2.2.1. Liekopisná metóda

Podľa Českého lékopisu 2009 sa sulfamerazín stanovuje pomocou odmernej analýzy. 0,2500 g stanovovanej látky sa rozpustí v zmesi 20 mL kyseliny chlorovodíkovej zriedenej RS a 50 mL vody R. Zmes sa ochladí vo vode s ľadom. Prevedie sa stanovenie dusíku v primárnych aromatických amínoch. K pripravenému roztoku sa pridajú 3 g bromidu draselného R. Pomaly a za stáleho miešania sa titruje odmerným roztokom dusitanu sodného 0,1 mol/L VS. Bod ekvivalencie sa identifikuje elektrometricky. 1 mL spotrebovaného odmerného roztoku dusitanu sodného 0,1 mol/L VS odpovedá 26,43 mg sulfamerazínu [18].

### 3.2.2.2. Publikované štúdie súvisiace so stanovením sulfamerazínu

V súvislosti so sulfonamidmi, a teda aj sulfamerazínom, bolo publikovaných množstvo článkov zaoberajúcich sa ich stanovením v rôznych typoch vzoriek (napr. v odpadovej vode, rôznych živočíšnych produktoch, sére, krmive pre zvieratá, atď.) a pomocou rôznych analytických postupov.

Reguera et al. predstavili **FIA** metódu pre stanovenie sulfamerazínu a ďalších sulfonamidov v mlieku za ampérometrickej detekcie [24].

Guo et al. prezentovali metódu stanovenia sulfamerazínu v rybníkovej vode a niekoľkých rybách. Pripravili **selektívny SPE sorbent** (MIP- molecularly imprinted polymer) a prepojili ho s **HPLC** pre efektívne stanovenie sulfamerazínu. Pripravený sorbent sa vyznačoval vysokou selektivitou pre sulfamerazín a mal veľký povrch. Dosiahli limit detekcie 1 ng/g a limit kvantifikácie 3,5 ng/g [25].

Batista et al. po prvýkrát predviedli metódu **on-line úpravy vzorky** (prečistenie a prekoncentrácia analytu) prepojenej so **sekvenčnou injekčnou chromatografiou** (SIC). Pri stanovení tak kombinujú princíp anión-výmennej SPE a mikrokolonky plnené

„fused-core“ časticami s obrátenou fázou pre separáciu 8 sulfonamidových antibiotík (sulfamerazínu, sulfadiazínu, sulfamethoxazolu atď.). Po separácii stanovili jednotlivé analyty pomocou spektrofotometrickej detekcie. Pre objem vzorky 500 µL dosiahli prekoncentračný faktor 39,2. Takto docielili limity detekcie medzi 4,9 a 27 µg/L [26].

Malintan a Mohd prezentovali **HPLC** metódu pre súčasné stanovenie sulfamerazínu a ďalších sulfonamidov v odpadovej vode zo zvieracích chovov. Pred stanovením prečistili vzorku pomocou Oasis HLB sorbentu. Detekcia prebiehala pomocou UV spektrofotometrie pri 272 nm. Pre sulfamerazín dosiahli limit kvantifikácie 7,5 ng/L [27].

Raviolo et al. stanovili sulfamerazín a súčasne iné sulfonamidy v mlieku pomocou **micelárnej kvapalinovej chromatografie** po derivatizácii pred vstupom na analytickú kolonu [28].

Arroyo-Manzanares et al. vyvinuli pre stanovenie sulfonamidov v sére analytickú metódu založenú na **SPE** spojenej s **kvapalinovou chromatografiou** a fotónovo-indukovanou fluorescenčnou detekciou [29].



## **4. Experimentálna časť**

### **4.1. Materiál**

#### **4.1.1. Chemikálie**

Sulfamerazín – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Methanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika

Voda destilovaná

Oasis HLB – Waters Corporation, Massachusetts, USA, veľkosť častíc 30  $\mu\text{m}$

#### **4.1.2. Prístroje a software**

Detektor USB2000, Ocean Optics Inc., Dunedin, USA

Piestové čerpadlo, FIALab Instruments, Bellevue, USA, objem piestu 5 mL

FIALab 3500 (s osemcestným ventilom), FIALab Instruments, Bellevue, USA

Software FIALab pre Windows verzia 5.9.321, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Osemcestný ventil, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Zdroj svetla DH-2000, Microspack, UV-VIS-NIR Lightsource

Optické vlákna, priemer 600  $\mu\text{m}$

Magnetická miešačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha, Česká Republika

## 4.2. Pracovný postup

### 4.2.1. Príprava roztokov

#### 4.2.1.1. Zásobné roztoky

Zásobný roztok sulfamerazínu o koncentrácii 100 ppm (100 mg/L) bol pripravený navážením 2,4 mg sulfamerazínu a doplnením po značku 25 mL odmernej banky destilovanou vodou.

Zásobný roztok sulfamerazínu o koncentrácii 1000 ppb (1000 µg/L) bol pripravený riedením 1 mL zásobného roztoku sulfamerazínu o koncentrácii 100 ppm a doplnením po značku 100 mL odmernej banky destilovanou vodou.

#### 4.2.1.2. Kalibračné roztoky

Kalibračné roztoky boli pripravené v 25 mL odmerných bankách zriedením zásobného roztoku sulfamerazínu (1000 ppb) destilovanou vodou (H<sub>2</sub>O). Koncentrácie pripravených kalibračných roztokov boli 1000 ppb, 500 ppb, 250 ppb, 100 ppb a 50 ppb. Ako slepý roztok bola použitá destilovaná voda (Tabuľka 1).

**Tabuľka 1: Príprava kalibračných roztokov**

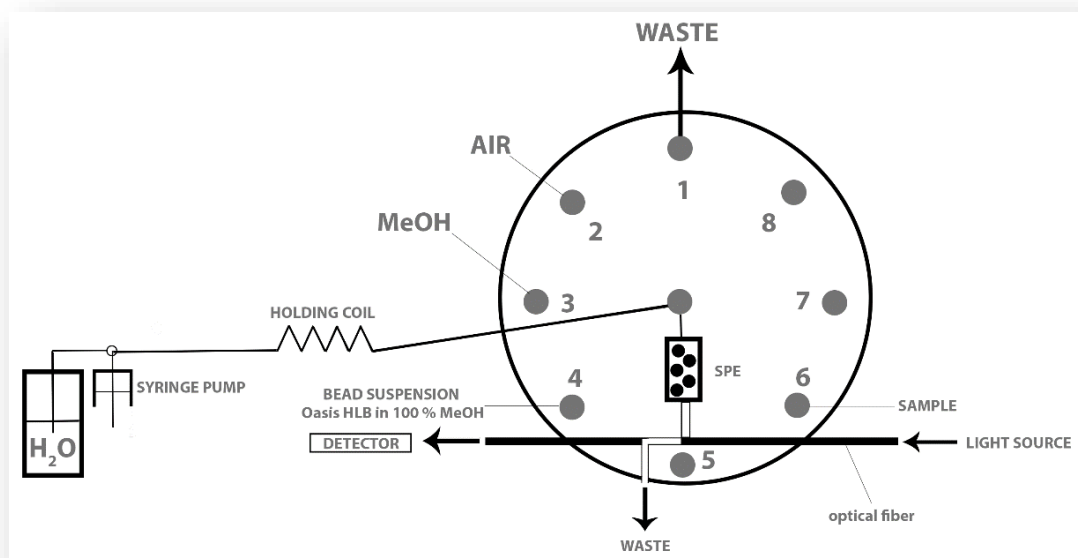
Koncentrácia roztoku (ppb)	Objem zásobného roztoku sulfamerazínu 1000 ppb (mL)	Objem H <sub>2</sub> O (mL)
1000	25,00	0
500	12,50	12,50
250	6,25	18,75
100	2,50	22,50
50	1,25	23,75
0	0	25,00

## 4.2.2. Výber postupu využitia sorbentu

Bola skúšaná kolona, naplnená suchými časticami sorbentu Oasis-HLB, ďalej kolonka vytvorená v LOV systéme pomocou aspirácie suspenzie častíc sorbentu z injekčnej striekačky a aspirácia suspenzie častíc zo sklenenej vialky umiestnenej na magnetickej miešačke. Vlastný výber je zhrnutý v kapitole 5.1.

## 4.2.3. Optimalizácia LOV systému

Bol vytvorený program, ktorý zaisťoval tvorbu kolonky pre SPE (solid phase extraction), jej premývanie, nasávanie reagensí a vlastnej vzorky, elúciu a následnú detekciu. Meranie bolo prevedené v LOV systéme s využitím UV-VIS spektrofotometrie. Detekcia prebiehala pri jednej vlnovej dĺžke 275 nm. Každé meranie bolo opakované trikrát proti slepému roztoku (destilovanej vode). Na všetky merania bol použitý systém FIALab 3500 s jedným piestovým čerpadlom a osemcestným ventilom. Schéma systému je uvedená na Obrázku 11.



Obrázok 11: Schéma systému

syringe pump- piestové čerpadlo

„bead“ suspension- „bead“ suspenzia

light source- zdroj svetla

SPE- extrakcia na tuhej fáze

holding coil- miešacia cievka

optical fibre- optické vlákno

sample- vzorka

detector- detektor

air- vzduch

waste- odpad

#### **4.2.3.1. Optimalizácia tvorby kolonky**

Zisťoval sa objem, rýchlosť prietoku pri aspirácii suspenzie častíc sorbentu Oasis-HLB v methanole z vialky umiestnenej na magnetickej miešačke. Taktiež sa skúmala prietoková rýchlosť, potrebná pre vytvorenie vlastnej kolonky v systéme LOV. Snažili sme sa vybrať podmienky pre tvorbu kolonky, tak aby bola kolonka naplnená rovnomerne, postup tvorby bol opakovateľný, bez vytvárania vysokého tlaku v prietokovom systéme. Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.1.

#### **4.2.3.2. Optimalizácia rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku**

Po zaistení optimálnej tvorby kolonky bola skúmaná optimálna rýchlosť prietoku pri nasávaní vodného roztoku vzorky na kolonku (sample loading). Skúmaný roztok bol aspirovaný do systému, a potom nízkou prietokovou rýchlosťou pretekal cez kolonku, na ktorej sa analyt zakoncentroval. Pre meranie bol použitý roztok štandardu o koncentrácii 1 ppm (1 µg/mL). Testovalo sa päť prietokových rýchlostí – 10 µL/s, 25 µL/s, 30 µL/s, 40 µL/s a 50 µL/s. Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.2.

#### **4.2.3.3. Optimalizácia objemu vzorky**

Boli testované štyri rôzne objemy vodného roztoku vzorky aspirované na kolonku – 500 µL, 1000 µL, 2000 µL a 5000 µL. Daný objem vzorky bol aspirovaný z odmernej banky do systému a následne sa nízkou prietokovou rýchlosťou nechal pretiecť cez kolonku. Skúmal sa vzťah medzi objemom vzorky a absorbanciou roztoku eluovaného z kolonky. Pre meranie bol použitý roztok štandardu o koncentrácii 1 ppm (1µg/mL). Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.3.

#### 4.2.3.4. Optimalizácia rýchlosti elúcie

Testovali sa štyri rôzne rýchlosti elúcie - 5  $\mu\text{L/s}$ , 10  $\mu\text{L/s}$ , 15  $\mu\text{L/s}$  a 25  $\mu\text{L/s}$ . Bol zisťovaný vzťah medzi rýchlosťou elúcie zakonzentrovaného analytu z kolonky a vlastnou absorbanciou eluátu. Elučným činidlom bol čistý methanol. Pre meranie sa použil roztok štandardu o koncentrácii 1 ppm (1  $\mu\text{g/mL}$ ). Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.4.

#### 4.2.3.5. Kalibračná závislosť

Po zabezpečení optimálnosti podmienok bola premeraná kalibračná závislosť. Merala sa absorbancia eluátu v rade kalibračných roztokov o koncentrácii 50 ppb, 100 ppb, 250 ppb, 500 ppb a 1000 ppb proti slepému roztoku (0 ppb). Následne bola vynesená táto závislosť do grafu. Zo získaných hodnôt bola vypočítaná rovnica regresie priamky. Taktiež bol stanovený limit detekcie (LOD) a limit kvantifikácie (LOQ) podľa nasledujúcich vzorcov:

$$LOD = \frac{3 * \sigma}{S} \qquad LOQ = \frac{10 * \sigma}{S}$$

$\sigma$  – smerodajná odchýlka merania

S – smernica kalibračnej krivky

Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.6.

#### 4.2.3.6. Opakovateľnosť

Zisťovala sa opakovateľnosť merania pri využití optimálnych podmienok. K meraniu absorbancie sa použili kalibračné roztoky o koncentrácii 500 ppb a 1000 ppb. Opakovateľnosť bola vyjadrená ako relatívna smerodajná odchýlka (RSD), ktorá bola vypočítaná z piatich meraní. Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.7.

#### **4.2.3.7. Analýza reálnej vzorky**

Účinnosť danej extrakcie bola nakoniec skúšaná pomocou reálnej vzorky. Použilo sa umelé sérum so známym pridaným množstvom sulfamerazínu. Následne sa sledovala absorbancia a posudzovala sa účinnosť vytvorenej extrakčnej metódy. Pre odstránenie rušivého vplyvu matrice bolo skúšané samotné sérum s pridaným analytom, zriedené sérum s pridaným analytom, ďalej premytie kolonky väčším množstvom vody a vyššej prietokovej rýchlosti v kroku premytie kolonky. Výsledky sú zhrnuté v kapitole 5.2.8.

## **5. Výsledky a diskusia**

### **5.1. Výber postupu využitia sorbentu**

Kritériom výberu bola optimálnosť tlaku v prietokovom systéme pri tvorbe kolonky a vlastnom meraní. Za optimálny sme považovali taký pracovný tlak, ktorý nebol príliš vysoký a nespôsoboval nám problémy pri meraní, napr. nízku opakovateľnosť merania, netesnosť systému, zastavenie merania. Pri využití vlastnej kolonky naplnenej suchými časticami sorbentu Oasis-HLB vznikol v systéme vysoký tlak, čo malo nepriaznivý vplyv na vlastné meranie. Následne sme skúšali aspirovať suspenziu častíc sorbentu z injekčnej striekačky upevnenej v jednom z portov, ale dochádzalo k upchávaniu portu a nedostatočnému naplneniu kolonky. Z toho dôvodu sme zvolili postup s využitím magnetickej miešačky, ktorá vo vialke neustále suspendovala častice tak, aby bola aspirácia častíc rovnomerná a dostatočne opakovateľná pre tvorbu kolonky v systéme LOV.

### **5.2. Optimalizácia LOV systému**

#### **5.2.1. Optimalizácia tvorby kolonky**

Cieľom bolo zaistiť automatizované, rovnomerné a konštantné plnenie kolonky v systéme LOV. Výsledky optimalizácie sú zhrnuté v Tabuľke 2.

**Tabuľka 2: Optimálne podmienky pre tvorbu kolonky**

<b>Parameter</b>	<b>Rozmedzie stanovenia</b>	<b>Výsledok</b>
Miešací pomer methanol : sorbent	1:1 – 5:1	<b>3:1</b>
Prietoková rýchlosť pri aspirácii	15 – 45 $\mu\text{L/s}$	<b>30 <math>\mu\text{L/s}</math></b>
Objem aspirovanej suspenzie	300 – 400 $\mu\text{L}$	<b>380 <math>\mu\text{L}</math></b>
Prietoková rýchlosť pre tvorbu kolonky	5 – 20 $\mu\text{L/s}$	<b>10 <math>\mu\text{L/s}</math></b>

Ako vyplýva z Tabuľky 2 pre tvorbu suspenzie častíc sorbentu v methanole bol stanovený vhodný miešací pomer. Na základe pokusu bol vybraný pomer 3 diely methanolu na 1 diel sorbentu. Pri pomere 1:1 dochádzalo k upchávaniu hadičiek systému, naopak pri pomere 5:1 bolo množstvo aspirovaných častíc nedostatočné. Rýchlosť aspirácie častíc bola stanovená na 30  $\mu\text{L/s}$ . Pri rýchlosti 15  $\mu\text{L/s}$  dochádzalo k usadzovaniu častíc sorbentu v hadičkách. Pri rýchlosti 45  $\mu\text{L/s}$  bolo množstvo aspirovaných častíc nedostatočné. Objem 380  $\mu\text{L}$  aspirovanej suspenzie častíc bol stanovený ako optimálny pre tvorbu kompaktnej kolonky. Pri objeme 300  $\mu\text{L}$  bola vytvorená kolonka príliš nízka, naopak pri objeme 400  $\mu\text{L}$  bola zbytočne vysoká. Prietoková rýchlosť pre tvorbu kolonky bola stanovená na 10  $\mu\text{L/s}$ . Pri rýchlosti 5  $\mu\text{L/s}$  dochádzalo k usadzovaniu častíc sorbentu v hadičkách, v dôsledku čoho sa nevytvorila dostatočne vysoká kolonka. Pri rýchlosti 20  $\mu\text{L/s}$  sa v systéme tvoril vysoký tlak, čo bolo nežiadúce. Vytvorená kolonka bola používaná opakovane v rámci jedného dňa merania, potom bola zo systému vymytá. Pri pokračovaní merania ďalší deň bola vytvorená nová kolonka.

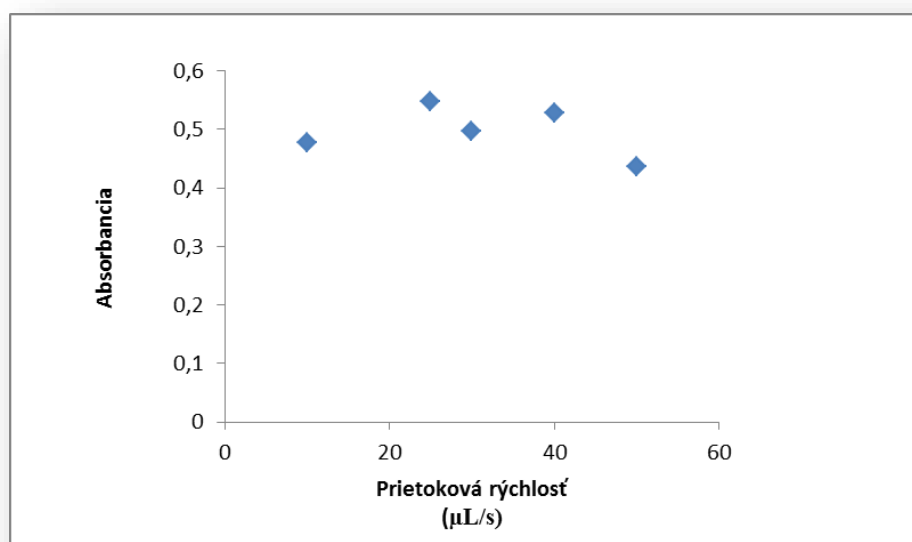


## 5.2.2. Optimalizácia rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku

Cieľom bolo zistiť, pri akej prietokovej rýchlosti dochádza k najväčšiemu zakoncentrovaniu stanovovanej látky na časticiach sorbentu tvoriacich kolonku. Kritériom stanovenia bola najväčšia odozva detektoru. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 3 a Obrázku 12.

Tabuľka 3: Optimalizácia prietokovej rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku

Prietoková rýchlosť ( $\mu\text{L/s}$ )	Absorbancia					
	Meranie					
	1	2	3	Priemer (P)	SD	RSD (%)
10	0,43	0,54	0,46	0,48	0,06	12,50
25	<b>0,54</b>	<b>0,54</b>	<b>0,57</b>	<b>0,55</b>	<b>0,02</b>	<b>3,64</b>
30	0,48	0,56	0,45	0,50	0,06	12,00
40	-	0,55	0,51	0,53	0,03	5,66
50	0,43	0,39	0,48	0,43	0,05	11,63



Obrázok 12: Závislosť prietokovej rýchlosti pri aspirácii vzorky na kolonku na absorbancii

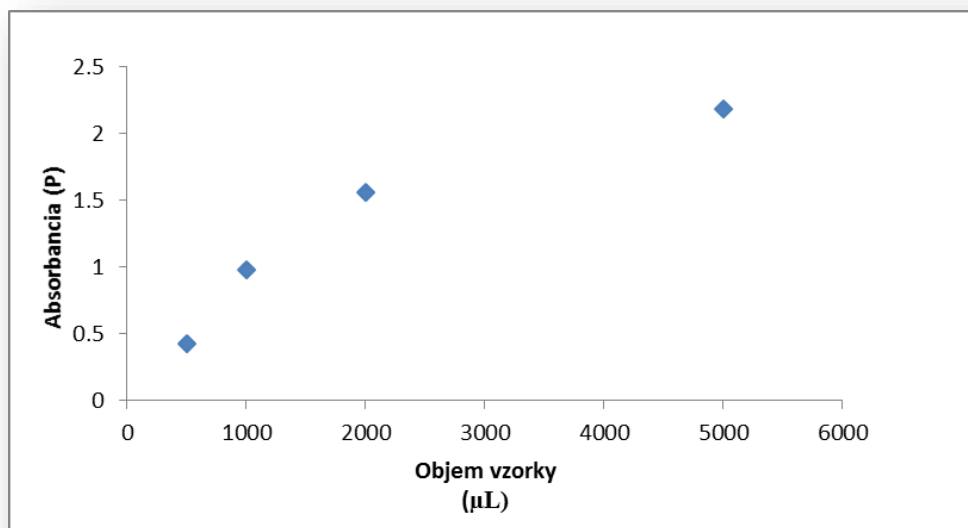
Pre prietokovú rýchlosť 40  $\mu\text{L/s}$  sú uvedené len dve hodnoty absorbančie. Posledná hodnota nie je uvedená v dôsledku výskytu šumu základnej línie. Z toho dôvodu nebolo možné absorbanciu odčítať. Ako vyplýva z uvedenej tabuľky a grafu, odozva detektoru bola najvyššia v prípade prietokovej rýchlosti 25  $\mu\text{L/s}$ . Preto bola táto prietoková rýchlosť zvolená ako optimálna pre zakoncentrovanie analytu.

### 5.2.3. Optimalizácia objemu vzorky

Cieľom bolo zistiť optimálny objem vzorky potrebný k aspirácii na kolonku. Kritériom hodnotenia bola dĺžka trvania jedného cyklu merania a intenzita odozvy detektoru pri elúcii zakoncentrovaného analytu. Výsledky merania sú zhrnuté v Tabuľke 4 a na Obrázku 13.

**Tabuľka 4: Optimalizácia objemu vzorky aspirovaného na kolonku**

Objem vzorku ( $\mu\text{L}$ )	Absorbancia					
	Meranie					
	1	2	3	Priemer (P)	SD	RSD (%)
<b>500</b>	0,38	0,52	0,41	0,44	0,07	15,91
<b>1000</b>	<b>1,01</b>	<b>0,95</b>	<b>0,99</b>	<b>0,98</b>	<b>0,03</b>	<b>3,06</b>
<b>2000</b>	1,53	1,55	1,60	1,56	0,04	2,56
<b>5000</b>	2,34	2,06	2,16	2,19	0,14	6,39



**Obrázok 13: Závislosť absorbancie na objeme aspirovanej vzorky na kolonku**

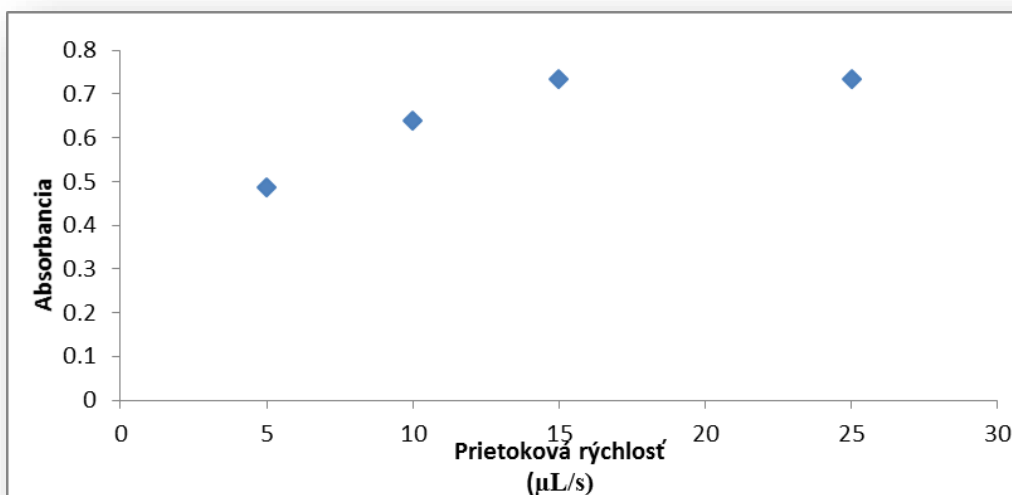
Ako vyplýva z vyššie uvedenej tabuľky a grafu so zvyšujúcim objemom vzorky sa zvyšuje aj absorbanca u eluátu. Taktiež dochádza aj k predĺženiu doby trvania jedného cyklu merania. Preto bol ako optimálny objem vzorky zvolený objem 1000 μL. Pri tomto objeme bola opakovateľnosť najlepšia a bolo zabezpečené dostatočné zakoncertovanie analytu.

#### **5.2.4. Optimalizácia rýchlosti elúcie**

Cieľom bolo zistiť vhodnú prietokovú rýchlosť, ktorá by zabezpečovala elúciu zakoncentrovaného analytu a prietok eluátu k detektoru. Kritériom stanovenia bola odozva detektoru. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 5 a Obrázku 14.

**Tabuľka 5: Optimalizácia rýchlosti elúcie analytu**

Prietoková rýchlosť ( $\mu\text{L/s}$ )	Absorbancia					
	Meranie					
	1	2	3	Priemer (P)	SD	RSD (%)
5	0,48	0,48	0,50	0,49	0,01	2,04
10	0,66	0,62	0,64	0,64	0,02	3,13
15	<b>0,80</b>	<b>0,63</b>	<b>0,77</b>	<b>0,73</b>	<b>0,09</b>	<b>12,33</b>
25	0,80	0,63	0,77	0,73	0,09	12,33



**Obrázok 14: Závislosť absorbancie na prietokovej rýchlosti pri elúcii**

Z Tabuľky 5 a Obrázku 14 vyplýva, že najvyššia absorbancia bola pri prietokovej rýchlosti 15  $\mu\text{L/s}$  a 25  $\mu\text{L/s}$ . Zvolili sme prietokovú rýchlosť 15  $\mu\text{L/s}$ , pretože pri nej nevznikal vysoký tlak v systéme a zabezpečovala dostatočné vymytie zakonzentrovaného analytu z kolonky.

### 5.2.5. Výsledný program

Výsledný program bol upravený na základe predchádzajúcich meraní. Výsledné optimálne parametre boli: prietoková rýchlosť pri zakoncentrovávaní analytu na kolonke 25  $\mu\text{L/s}$ , objem vzorky 1000  $\mu\text{L}$ , rýchlosť elúcie zakoncentrovaného analytu 15  $\mu\text{L/s}$ .

#### Program na torbu kolonky

<p style="text-align: center;"><b>Aspirácia suspenzie častíc</b></p>	<p>Syringe Pump1 Command (?) KOR  Syringe Pump1 Valve Out  Valve port 8 <i>Air</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 100  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 3 <i>MeOH</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 60  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 300  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 4 <i>Bead</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 60  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 300  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 30  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 380  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
<p style="text-align: center;"><b>Vlastná tvorba kolonky</b></p>	<p>Valve port 5  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 10  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 350  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
<p style="text-align: center;"><b>Vymytie zbytku sorbentu do odpadu</b></p>	<p>Syringe Pump1 Valve In  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 1000  Syringe Pump1 Delay Until Done  Delay (sec) 5</p> <p>Syringe Pump1 Valve Out  Valve port 1  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 1000  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>

## Ovládací program

<b>Príprava kolonky</b>	<b>Premytie kolonky vodou</b>	<p>Syringe Pump1 Command (?) KOR</p> <p>Syringe Pump1 Valve In <i>H2O</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100</p> <p>Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 250</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Valve Out</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 10</p> <p>Syringe Pump1 Dispense (microliter) 250</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
	<b>Premytie kolonky methanolom</b>	<p>Valve port 8 <i>Air</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 40</p> <p>Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 100</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 3 <i>MeOH</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100</p> <p>Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 250</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 10</p> <p>Syringe Pump1 Dispense (microliter) 250</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
<b>Aspirácia vzorky na kolonku</b>	<b>Vlastná aspirácia</b>	<p>Valve port 6 <i>Sample</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 50</p> <p>Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 1000</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 25</p> <p>Syringe Pump1 Dispense (microliter) 1050</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Delay (sec) 5</p>
	<b>Premytie miešacej cievky vodou</b>	<p>Syringe Pump1 Valve In <i>H2O</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100</p> <p>Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 200</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Valve Out</p> <p>Valve port 1 <i>Waste</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100</p> <p>Syringe Pump1 Dispense (microliter) 200</p> <p>Syringe Pump1 Delay Until Done</p>

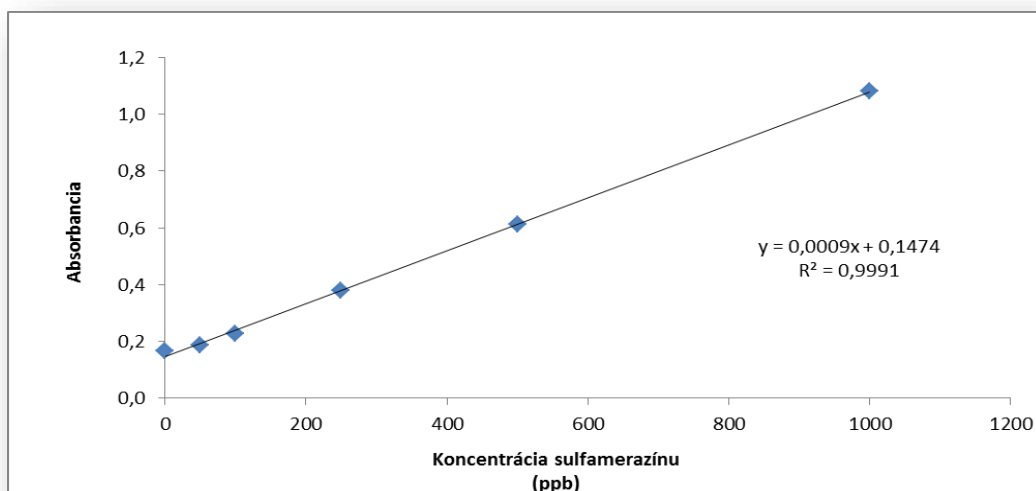
<b>Premytie kolonky destilovanou vodou</b>		<p>Syringe Pump1 Valve In <i>H2O</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 1000  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Valve Out</p> <p>Valve port 1 <i>Waste</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 150  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 10  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 900  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
		<p>Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 275</p> <p>Valve port 8 <i>Air</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 100  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Valve port 3 <i>MeOH</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 300  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>
<b>Elúcia vzorky</b>	<b>Aspirácia elučného činidla</b>	<p>Spectrometer Reference Scan  Spectrometer Absorbance Scanning</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 15  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 300  Syringe Pump1 Delay Until Done  Spectrometer Stop Scanning</p>
	<b>Meranie absorbancie</b>	
<b>Premytie kolonky destilovanou vodou</b>		<p>Valve port 1 <i>Waste</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Empty  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Valve In <i>H2O</i></p> <p>Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 100  Syringe Pump1 Aspirate (microliter) 1000  Syringe Pump1 Delay Until Done</p> <p>Syringe Pump1 Valve Out</p> <p>Valve port 5 <i>Microcolumn</i>  Syringe Pump1 Flowrate (microliter/sec) 20  Syringe Pump1 Dispense (microliter) 1000  Syringe Pump1 Delay Until Done</p>

## 5.2.6. Kalibračná závislosť

Kalibračnú závislosť sme testovali v rozmedzí 0 ppb až 1000 ppb. Boli z nej vyjadrené parametre lineárnej regresie a parametre LOD a LOQ. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 6 a na Obrázku 15.

**Tabuľka 6: Kalibračná závislosť**

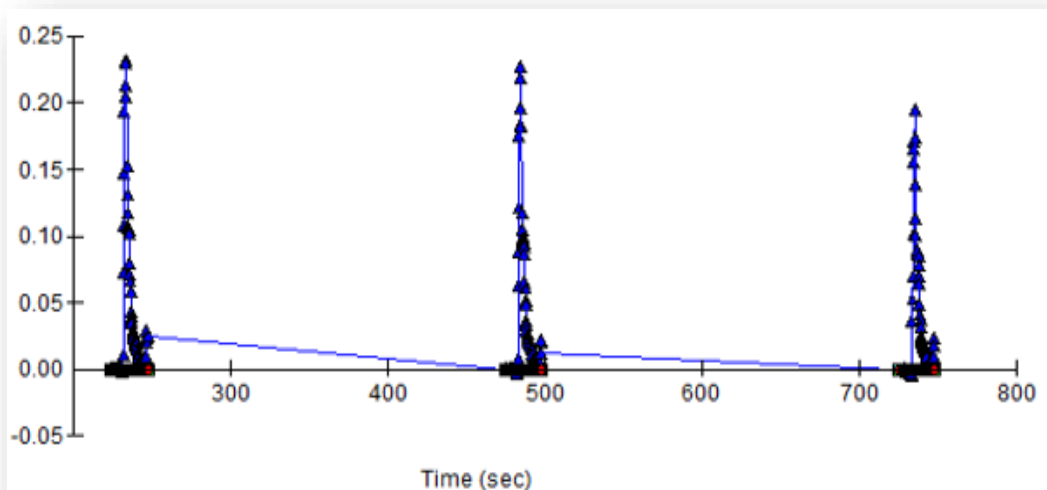
Koncentrácia kalibračného roztoku (ppb)	Absorbancia					
	Meranie					
	1	2	3	Priemer (P)	SD	RSD (%)
0	0,16	0,17	-	0,17	0,01	5,88
50	0,19	0,19	0,18	0,19	0,01	3,04
100	0,23	0,23	0,22	0,23	0,01	2,51
250	0,40	0,33	0,41	0,38	0,04	11,48
500	0,64	0,60	0,60	0,61	0,02	3,79
1000	1,09	1,09	1,07	1,08	0,01	1,07



**Obrázok 15: Kalibračná krivka**



V rozmedzí 0 ppb až 1000 ppb absorbancia lineárne rastie. Kalibračná krivka má korelačný koeficient 0,99950. Z kalibračnej krivky bol vyjadrený parameter limit detekcie (LOD = 71,70  $\mu\text{g/L}$ ) a parameter limit kvantifikácie (LOQ = 238,99  $\mu\text{g/L}$ ). Pre slepý roztok o koncentrácii 0 ppb, boli použité len dve hodnoty. Posledné meranie vykazovalo veľký šum, spôsobený prítomnosťou mikrobublinky pri detekcii. Z toho dôvodu nebolo možné odčítať absorbanciu daného roztoku. Na Obrázku 16 je uvedený záznam jedného merania za optimálnych podmienok pre koncentráciu 100 ppb.



**Obrázok 16: Záznam merania pre koncentráciu 100 ppb**

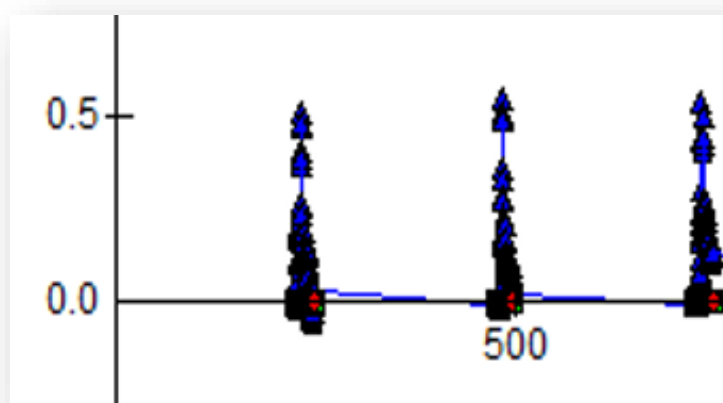
### 5.2.7. Opakovateľnosť

Opakovateľnosť sme zisťovali za optimálnych podmienok pri koncentrácii štandardu 500 ppb a 1000 ppb. S jedným štandardom sme meranie opakovali päťkrát a stanovovali sme absorbanciu u eluátu. Výsledky sú zhrnuté v Tabuľke 7.

**Tabuľka 7: Opakovateľnosť merania**

<b>Meranie</b>	<b>500 ppb</b>	<b>1000 ppb</b>
<b>1</b>	0,51	1,17
<b>2</b>	0,55	1,33
<b>3</b>	0,53	1,24
<b>4</b>	0,57	1,31
<b>5</b>	0,51	1,39
<b>Priemer (P)</b>	0,53	1,29
<b>SD</b>	0,03	0,08
<b>RSD (%)</b>	<b>5,66</b>	<b>6,60</b>

Hodnota relatívnej smerodajnej odchýlky bola pri koncentrácii 500 ppb 5,66% a pri koncentrácii 1000 ppb 6,60%. Tieto hodnoty charakterizujú nižšiu opakovateľnosť. To môže byť spôsobené prítomnosťou mikrobubliny v eluáte alebo momentálnym zvýšeným tlakom v systéme. Na Obrázku 17 je časť záznamu merania opakovateľnosti pre koncentráciu 500 ppb.



**Obrázok 17: Časť záznamu merania opakovateľnosti**

### 5.2.8. Analýza reálnej vzorky

Cieľom bolo overiť účinnosť vyvinutej extrakčnej metódy pomocou umelého séra so známym pridaným množstvom sulfamerazínu. Sledovali sme absorbanciu, či detekované množstvo analytu zodpovedá skutočnej koncentrácii analytu v sére.

Najskôr sme skúšali použiť umelé sérum s pridaným analytom. Ani pri viacnásobnom opakovaní merania sa nám nepodarilo dosiahnuť zreteľný pík. Vplyv matrice bol veľmi rušivý a znemožňoval odčítanie maxima absorbancie.

Preto sme vyskúšali použitie zriedeného séra. K 1 mL umelého séra sme pridali známe množstvo analytu a potom zriedili destilovanou vodou na objem 10 mL. Ani pri tejto metóde sa však nepodarilo dosiahnuť zreteľný pík. Matrica pôsobila stále rušivo a výsledný signál bol nečitateľný.

Skúsili sme teda použiť väčší objem vody k premytiu kolonky v kroku premytie. Taktiež sme skúsili použiť v tomto kroku aj vyššiu prietokovú rýchlosť vody, či nedôjde k lepšiemu vymytiu matrice z kolonky. Avšak ani pri týchto krokoch sme neboli úspešní.

Ako z uvedeného vyplýva, umelé sérum, teda matrica vzorky, nám pri stanovení spôsobovalo problémy. Vytváralo vysoký šum a prekrývalo pík stanovovanej látky (sulfamerazínu), takže nebolo možné odčítať absorbanciu analytu. Pri zriedení séra a zväčšení objemu vody na vymytie matrice sme síce videli pík eluovaného analytu, ale predstavoval približne len 25 % očakávanej výšky píku pre danú koncentráciu.

Ďalším krokom, ktorý by viedol k zlepšeniu, by mohlo byť použitie iného rozpúšťadla pre premytie kolonky. Namiesto destilovanej vody by mohla byť použitá zmes vody s organickým rozpúšťadlom, napríklad zmes voda – methanol v koncentračnom pomere 95:5 (V/V), prípadne zmes vody s acetonitrilom v koncentračnom pomere 95:5 (V/V). Tiež by mohla pomôcť centrifugácia vzorky pred nástrekom na mikrokolonku. Pri rozlíšení matrice od eluovaného vzorku by tiež mohlo pomôcť zaradenie separačného kroku.

## 6. Súhrn

V rámci experimentálnej práce bol najskôr vybraný najvhodnejší spôsob využitia sorbentu. Potom bola vytvorená celá metóda stanovenia sulfamerazínu z vodných roztokov, vzhľadom k zamýšľanému použitiu k stanoveniu sulfamerazínu z umelého séra. Za extrakčné rozpúšťadlo bol stanovený čistý methanol vzhľadom k použitému sorbentu Oasis HLB.

V systéme SIA boli postupne optimalizované parametre merania: vlastná tvorba kolonky, prietoková rýchlosť aspirácie vzorky na kolonku, objem vzorky, prietoková rýchlosť elúcie.

Výsledné optimalizované parametre sú zhrnuté v Tabuľke 8.

Po optimalizácii bola premeraná kalibračná závislosť, následne bol vypočítaný limit detekcie a limit kvantifikácie. Potom bola za optimálnych podmienok premeraná opakovateľnosť pre koncentrácie 500 ppb a 1000 ppb.

Nakoniec bola skúšaná účinnosť metódy na umelom sére so známym pridaným množstvom sulfamerazínu. Nebolo však prakticky dosiahnuté uspokojivé využitie metódy. Na záver boli teoreticky navrhnuté možnosti riešenia vzhľadom k využitiu metódy pre reálne vzorky.

**Tabuľka 8: Výsledné optimalizované parametre**

<b>Parameter</b>	<b>Výsledok</b>
Extrakčné rozpúšťadlo	Methanol
Spôsob využitia sorbentu	Tvorba kolonky pomocou magnetickej miešačky
Miešací pomer methanol : sorbent pri tvorbe kolonky	3:1
Rýchlosť aspirácie suspenzie sorbentu	30 $\mu\text{L/s}$
Objem aspirovanej suspenzie sorbentu	380 $\mu\text{L}$
Prietoková rýchlosť pre tvorbu kolonky	10 $\mu\text{L/s}$
Rýchlosť aspirácie vzorky na kolonku	25 $\mu\text{L/s}$
Objem vzorky	1000 $\mu\text{L}$
Rýchlosť elúcie analytu	15 $\mu\text{L/s}$

## 7. Záver

Cieľom tejto diplomovej práce bolo optimalizovať metódu pre stanovenie sulfamerazínu s využitím extrakcie na pevnej fáze a automatizovať ju v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy pomocou LOV techniky s UV detekciou. Keď boli nájdené optimálne parametre, bola premeraná kalibračná závislosť s výsledným korelačným koeficientom 0,99950. Bol stanovený limit detekcie (LOD= 71,70  $\mu\text{g/L}$ ) a limit kvantifikácie (LOQ= 238,99  $\mu\text{g/L}$ ). Potom bola overená opakovateľnosť merania, ktorá bola následne vyjadrená relatívnymi smerodajnými odchýlkami. Pre koncentráciu 500 ppb predstavovala relatívna smerodajná odchýlka 5,66% a pre koncentráciu 1000 ppb 6,60%. Nakoniec bola účinnosť vyvinutej metódy skúšaná pomocou umelého séra so známym pridaným množstvom analytu.

## 8. Zoznam literatúry

- [1] Sequential Injection Analysis. *FIALab Leaders in Flow Injection Technology* [Online] [http://flowinjection.com/images/Sequential\\_Injection.pdf](http://flowinjection.com/images/Sequential_Injection.pdf) (accessed April 4, 2015).
- [2] van Staden, J.F.; Stefan, R.I. Chemical Speciation by Sequential Injection Analysis: an Overview. *Talanta* [Online] **2004**, *64*, p 1109. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914004003236> (accessed Apr 4, 2015).
- [3] Růžička, J. Flow Injection Analysis: Tutorial and News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online] **2015 ed.**, <http://www.flowinjectiontutorial.com/index.html> (accessed Apr 4, 2015).
- [4] Paseková, H.; Polášek, M.; Solich, P. Sekvenční Injekční Analýza. *Chemické listy* [Online] **1999**, *93*, p 354-359. [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999\\_06\\_354-359.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1999_06_354-359.pdf) (accessed Apr 4, 2015).
- [5] Barnett, N.W.; Lenehan, C.E.; Lewis, S.W. Sequential Injection Analysis: an Alternative Approach to Process Analytical Chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **1999**, *18*, p 346. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993698001149> (accessed Apr 4, 2015).
- [6] Miró, M.; Hansen, E.H. Recent Advances and Future Prospects of Mesofluidic Lab-on-a-Valve Platforms in Analytical Science: A Critical Review. *Analytica Chimica Acta* [Online] **2012**, *750*, p 3. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267012004928> (accessed Apr 15, 2015).

- [7] Miró, M.; Oliveira, H.M.; Segundo, M.A. Analytical Potential of Mesofluidic Lab-on-a-Valve as a Front End to Column-Separation Systems. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **2011**, *30*, p 153.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993610002682>  
(accessed Apr 15,2015).
- [8] FIALab-3500 Sequential and Flow Injection Analyzer. *FIALab Leaders in Flow Injection Technology* [Online] <http://flowinjection.com/index.php/products/sia-analyzers?pid=59&sid=105:fialab-3500> (accessed Apr 15, 2015).
- [9] Luque de Castro, M.D.; Ruiz-Jiménez, J.; Pérez-Serradilla, J.A. Lab-on-Valve: A Useful Toll in Biochemical Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **2008**, *27*, p 118.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993608000058> (accessed Apr 15, 2015).
- [10] Lab-on-Valve SIA. *FIALab* [Online] <http://flowinjection.com/index.php/products?sid=102&pid=54> (accessed Apr 15, 2015).
- [11] Yu, Y-L.; Jiang, Y.; Chen, M-L.; Wang, J-H. Lab-on-Valve in the Miniaturization of Analytical Systems and Sample Processing for Methal Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **2011**, *30*, p 1649.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993611002421> (accessed Apr 15, 2015).
- [12] Bead Injection. *FIALab Leaders in Flow Injection Technology* [Online] [http://www.flowinjection.com/images/Bead\\_Injection.pdf](http://www.flowinjection.com/images/Bead_Injection.pdf) (accessed Apr 19, 2015).
- [13] Boonjob, W. An Overview about Recent Advances of Micro-Solid Phase Extraction in Flow Based Techniques. *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry* [Online] **2014**, *1*, p 1006.  
<http://austinpublishinggroup.com/analytical-pharmaceutical-chemistry/fulltext/ajapc-v1-id1006.php#> (accessed Apr 19, 2015).



- [14] Poole, C.F. New Trends in Solid-Phase Extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **2003**, 22, p 362.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993603006058> (accessed Apr 19, 2015).
- [15] Kolev, S.D.; McKelvie, I.D. Advances in Flowinjection Analysis and Related Techniques, 1st ed. [Online]; Comprehensive Analytical Chemistry; Elsevier: Amsterdam, NL, **2008**; 54, pp. 382-383.  
<https://books.google.cz/books?id=d0xi1huf3QMC&printsec=copyright&hl=sk#v=onepage&q&f=false> (accessed Apr 20, 2015).
- [16] Ampan, P.; Ruzicka, J.; Atallah, R.; Christian, G.D.; Jakmune, J.; Grudpan, K. Exploiting Sequential Injection Analysis with Bead Injection and Lab-On-Valve for Determination of Lead Using Electrothermal Atomic Absorption Spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* [Online] **2003**, 499, p 167.  
[http://www.researchgate.net/profile/Kate\\_Grudpan/publication/222023831\\_Exploiting\\_sequential\\_injection\\_analysis\\_with\\_bead\\_injection\\_and\\_lab-on-valve\\_for\\_determination\\_of\\_lead\\_using\\_electrothermal\\_atomic\\_absorption\\_spectrometry/links/53d59fd80cf220632f3d5aeb.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Kate_Grudpan/publication/222023831_Exploiting_sequential_injection_analysis_with_bead_injection_and_lab-on-valve_for_determination_of_lead_using_electrothermal_atomic_absorption_spectrometry/links/53d59fd80cf220632f3d5aeb.pdf) (accessed Apr 21, 2015).
- [17] Vidigal, S.; Tóth, I.; Rangel, A. Exploiting the Bead Injection LOV Approach to Carry Out Spectrophotometric Assays in Wine: *Application to the Determination of Iron*. *Talanta* [Online] **2011**, 84, p 1298.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011000750> (accessed Apr 21, 2015)
- [18] Český lékopis 2009: Doplněk 2013. Grada Publishing a.s.: Praha, CZ, 2013
- [19] Vzorec Sulfamerazínu. *Sigma Aldrich* [Online]  
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/s8876?lang=en&region=CC> (accessed Mar 15, 2015).
- [20] Klimeš, J., et al. *Kontrolně-Analytické Hodnocení Léčiv Lékopisnými Metodami*, 1. vydání; Nucleus HK: HK, 2011.

- [21] Miró, M.; Hartwell, S.K.; Jakmune, J.; Grudpan, K.; Hansen, E.H. Recent Developments in Automatic Solid-Phase Extraction with Renewable Surfaces Exploiting Flow Based Approaches. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [Online] **2008**, *27*, p 749. (Revised) [http://orbit.dtu.dk/fedora/objects/orbit:22299/datastreams/file\\_5120874/content](http://orbit.dtu.dk/fedora/objects/orbit:22299/datastreams/file_5120874/content) (accessed Apr 22, 2015).
- [22] Hartl, J.; Doležal, M.; Miletín, M.; Opletalová, V.; Zimčík, P. *Farmaceutická Chemie IV*, 2nd ed.; Univerzita Karlova v Praze- Nakladatelství Karolinum: Praha, CZ, 2012; pp. 63-67
- [23] Dobšíková, R.; Šíroková, Z. Farmakologie v Produkci Potravín a Rezidua Léčiv v Potravínách [PDF]; Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno: Brno, 2014. pp. 58-60 <http://www.vfu.cz/inovace-bc-a-navmgr/realizovane-klicove-aktivity/skripta/ls-2013-2014/farmakologie-v-produkci-potravin-a-rezidua-leciv-v-potravinach.pdf> (accessed Apr 22, 2015)
- [24] Reguera, C.; Ortiz, M.C.; Herrero, A.; Sarabia, L.A. Optimization of a FIA System with Amperometric Detection by Means of a Desirability Function: *Determination of Sulfadiazine, Sulfamethazine and Sulfamerazine in Milk*. *Talanta* [Online] **2008**, *75*, p 274. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914007007783> (accessed Apr 22, 2015).
- [25] Guo, L.; Jiang, X.; Yang, C.; Zhang, H. Analysis of Sulfamerazine in Pond Water and Several Fishes by High-Performance Liquid Chromatography Using Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [Online] **2008**, *391*, p 2291. <http://link.springer.com/article/10.1007/s00216-008-2131-8> (accessed Apr 22, 2015).
- [26] 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* [Online] **2015**, *133*, p 142. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914014006249> (accessed Apr 23, 2015).

- [27] Malintan, N.T.; Mohd, M.A. Determination of Sulfonamides in Selected Malaysian Swine Wastewater by High-Performance Liquid Chromatography. *Jurnal of Chromatography A* [Online] **2006**, *1127*, p 154. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306011356> (accessed Apr 23, 2015).
- [28] Raviolo, M.A.; Rambla-Alegre, M.; Clausell-Tormos, J.; Capella-Peiró, M.-E.; Carda-Broch, S.; Esteve-Romero, J. Determination of Sulfonamides in Milk After Precolumn Derivatisation by Micellar Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta* [Online] **2007**, *593*, p 152. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267007008562> (accessed Apr 23, 2015).
- [29] Arroyo-Manzanares, N.; Lara, F.J.; Airado-Rodríguez, D.; Gámiz-Gracia, L.; García-Campaña, A.M. Determination of Sulfonamides in Serum by On-Line Solid-Phase Extraction Coupled to Liquid Chromatography With Photoinduced Fluorescence Detection. *Talanta* [Online] **2015**, *138*, p 258. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914015001654> (accessed Apr 23, 2015).

## Zoznam tabuliek

- Tabuľka 1**    Príprava kalibračných roztokov
- Tabuľka 2**    Optimálne podmienky pre tvorbu kolonky
- Tabuľka 3**    Optimalizácia prietokovej rýchlosti aspirácie vzorky na kolonku
- Tabuľka 4**    Optimalizácia objemu vzorky aspirovaného na kolonku
- Tabuľka 5**    Optimalizácia rýchlosti elúcie analytu
- Tabuľka 6**    Kalibračná závislosť
- Tabuľka 7**    Opakovateľnosť merania
- Tabuľka 8**    Výsledné optimalizované parametre

## Zoznam obrázkov

- Obrázok 1** Schematické znázornenie systému SIA
- Obrázok 2** Princíp zmeny smeru toku v SIA
- Obrázok 3** Zastavenie toku v miešacej cievke
- Obrázok 4** Zastavenie toku v prietokovej cele
- Obrázok 5** SIA- LOV formát
- Obrázok 6** Cesta svetelného lúča cez prietokovú celou
- Obrázok 7** Princíp „bead injection“ techniky v konfigurácii  $\mu$ SI chromatografie
- Obrázok 8** Schematické znázornenie SIA-LOV systému pre „bead injection“ techniku
- Obrázok 9** Elúcia analytu z mikrokolonky a detekcia v prietokovej cele LOV jednotky
- Obrázok 10** Vzorec sulfamerazínu
- Obrázok 11** Schéma systému
- Obrázok 12** Závislosť prietokovej rýchlosti, pri aspirácii vzorky na kolonku, na absorbancii
- Obrázok 13** Závislosť absorbancie na objeme aspirovanej vzorky na kolonku
- Obrázok 14** Závislosť absorbanice na prietokovej rýchlosti pri elúcii
- Obrázok 15** Kalibračná krivka
- Obrázok 16** Záznam merania pre koncentráciu 100 ppb
- Obrázok 17** Časť záznamu merania opakovateľnosti