**Univerzita Karlova**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

# Využití sorbentů na bázi oxidu křemičitého pro on-line extrakci na tuhou fázi v průtokových metodách

(diplomová práce)

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

**Hradec Králové, 2018**

Bc. Hana Chrástková

# Prohlášení

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

V Hradci Králové, dne …….

…….

Bc. Hana Chrástková

**Poděkování**

Na tomto místě děkuji svému školiteli PharmDr. Petru Chocholoušovi, Ph.D. za odborné vedení mé diplomové práce, vstřícný přístup, připomínky a čas, který věnoval konzultacím.

# Abstrakt v českém jazyce

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Student: Bc. Hana Chrástková

Školitel: PharmDr. Petr Chocholouš Ph.D.

Název diplomové práce: Využití sorbentů na bázi oxidu křemičitého pro on-line extrakci na tuhou fázi v průtokových metodách.

Tato práce je věnována extrakcím látek (methylparaben, butylparaben, vitamin E, vitamin D3, Sudan I, II a IV, β-estradiol, estriol, estron) metodou on-line extrakce na tuhou fázi s využitím sorbentu pro podporovanou kapalinovou extrakci automatizovanou pomoci sekvenční injekční analýzy. Byly vybrány látky o různých chemických vlastnostech, pro něž byly optimalizovány parametry s cílem dosáhnout co nejvyšší výtěžnost extrakce. Testován byl objem vzorku nadávkovaný do systému, rychlost průtoku vzorku při dávkování na kolonu, koncentrace extrahované látky, vliv pH, druh rozpouštědla vzorku a délka časového intervalu pro adsorpci vzorku. Za optimalizovaných podmínek byla u vybraných vzorků měřena opakovatelnost metody a vytvořeny kalibrační křivky.

# Abstrakt v anglickém jazyce

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Student: Bc. Hana Chrástková

Supervisor: PharmDr. Petr Chocholouš, Ph.D.

Title of diploma thesis: Use of silica sorbents for on-line solid phase extraction in flow methods.

The diploma thesis is devoted to the extractions of substances such as Methylparaben, Butylparaben, α-tocopherol, Cholecalcipherol, Sudan I, II and IV, β-estradiol, Estriol, Estrone using on-line solid phase extraction with sorbent for Supported Liquid Extraction automated by Sequential Injection Analysis method. Substances of different chemical properties were selected, and extraction parameters were optimized to achieve the highest possible extraction recovery. The following parameters were tested: the volume of sample loaded in the column, sample loading flow rate, analyte concentration, effects of pH and kind of solvent of sample, time interval for sample adsorption. Under optimized conditions, the repeatability of the method and calibration curves of selected analytes were measured.

**Obsah**

Seznam použitých zkratek ..... 7
1. Úvod ..... 8
2. Cíl a zadání práce ..... 9
3. Teoretická část ..... 10
3.1 Sekvenční injekční analýza ..... 10
3.1.1 Schéma přístroje ..... 10
3.1.2 Lab-on-valve uspořádání ..... 11
3.2 Podporovaná kapalinová extrakce ..... 12
3.3 Chemické vlastnosti testovaných látek ..... 14
4. Experimentální část ..... 21
4.1 Použité přístroje a pomůcky ..... 21
4.2 Použité chemikálie ..... 22
4.3 Použité zásobní roztoky ..... 23
4.4 Použité pracovní roztoky a jejich příprava ..... 24
4.5 Výběr rozpouštědla ..... 27
4.6 Průběh měření ..... 28
4.6.1 Optimalizace parametrů ..... 29
4.6.2 Kalibrační křivky a opakovatelnost ..... 33
5. Výsledky ..... 37
5.1 Optimalizace podmínek ..... 37
5.2 Kalibrační křivky a opakovatelnost ..... 41
6. Diskuze celé práce ..... 48
7. Závěr ..... 50
8. Bibliografie ..... 51
9. Příloha ..... 54

# Seznam použitých zkratek

| | |
|---|---|
| **FIA** | Průtoková injekční analýza, (Flow Injection Analysis) |
| **LLE** | Extrakce z kapaliny do kapaliny, (Liquid-liquid Extraction) |
| **NaCl** | Chlorid sodný, (Natrium Chloride) |
| **SIA** | Sekvenční injekční analýza, (Sequential Injection Analysis) |
| **SLE** | Podporovaná kapalinová extrakce, (Supported Liquid Extraction) |
| **SPE** | Extrakce na tuhou fázi, (Solid-phase Extraction) |

# 1. Úvod

Extrakce analytu ze směsného vzorku je jedním z preanalytických postupů, který má významný vliv na výsledek následné analýzy (přesnost, detekční limity metody) extrahované látky. Aktuálním trendem je využití extrakčních postupů, které vyžadují použití co nejmenšího množství organických rozpouštědel, jsou časově nenáročné, specifické, citlivé a je možné je automatizovat, neboť stanovované analyty obsažené v komplexním vzorku jsou často přítomny pouze v nízkých koncentracích. Z tohoto důvodu je výhodné, dojde-li při extrakci rovněž k zakoncentrování analytu do menšího objemu.

# 2. Cíl a zadání práce

Cílem této diplomové práce bylo testování možností spojení metod sekvenční injekční analýzy a extrakce na tuhou fázi s využitím sorbentu pro podporovanou kapalinovou extrakci. Vyvíjená metoda byla testována pomocí extrakce pracovních roztoků látek o různých vlastnostech. Jedna polovina experimentální části byla věnována optimalizaci extrakčních podmínek metody pro vybrané látky, druhá polovina experimentů byla zaměřena na proměření kalibračních křivek a zjištění opakovatelnosti zvolené extrakční metody.

# 3. Teoretická část

## 3.1 Sekvenční injekční analýza

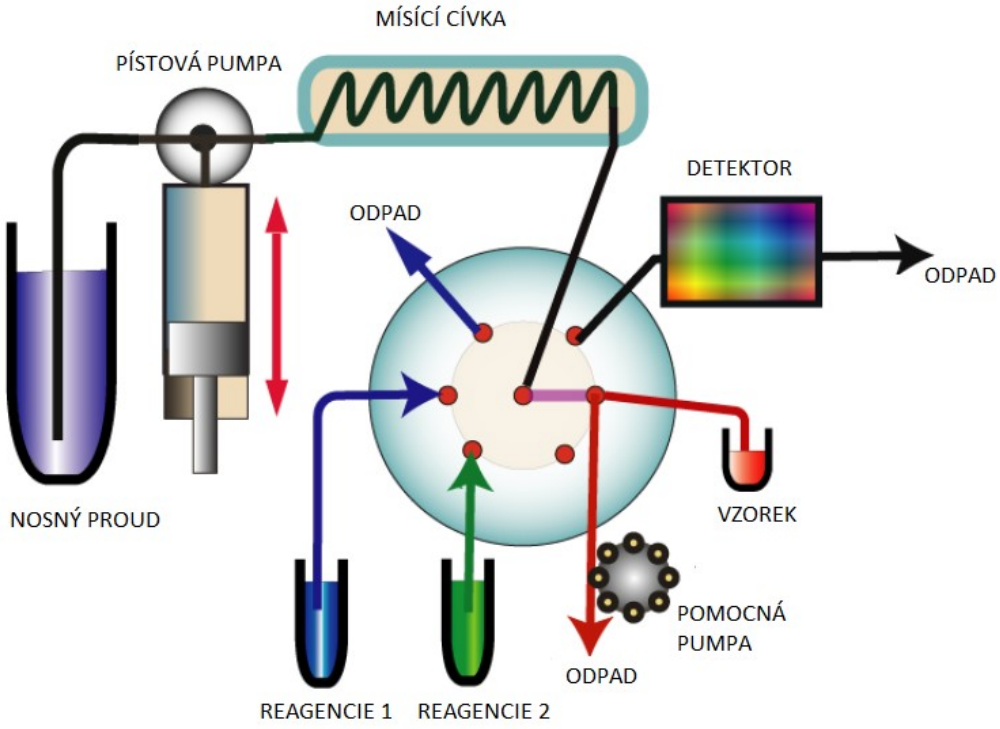
Sekvenční injekční analýza (SIA) je průtoková metoda vhodná k automatizaci některých analytických postupů. Výhodné je použití zejména u náročnějších postupů větších sérií vzorků. SIA vývojově navazuje na techniku průtokové injekční analýzy (FIA) a odstraňuje některé její nedostatky (1).

Hlavním rozdílem je použití dvousměrné pístové pumpy namísto peristaltické pumpy. Po aspiraci určitého objemu vzorku, nosného proudu a činidla skrze vícecestný selekční ventil do mísící cívky dojde ke změně směru toku, díky čemuž dochází k mnohem lepšímu promísení aspirovaných reagencií a tvorbě detekovatelného produktu. Produkt je dále posouván směrem k detektoru. Při průchodu detektorem dochází k zaznamenání signálu v podobě píku (2).

Veškeré kroky se řídí předem připraveným programem, který je řízen počítačem. Rovněž pomocí počítače jsou sbírána, ukládána a vyhodnocována naměřená data. Vzhledem k měnitelným parametrům (např. výše aspirovaného objemu, rychlost průtoku vzorku systémem) je tento systém velmi variabilní. Vysoká reprodukovatelnost výsledků je dána přesnou synchronizací mezi pohybem pístu čerpadla a přepínáním poloh vícecestného selekčního ventilu (1).

### 3.1.1 Schéma přístroje

Přístroj SIA je tvořen jednokanálovou pístovou pumpou, řízenou krokovým elektromotorem, šesti, osmi nebo deseticestným selekčním ventilem, detektorem (nejčastěji spektrofotometrickým, ale podle zvolené reakce lze použít i elektrochemický či fluorescenční), mísící cívkou a plastovými hadičkami, které tyto komponenty propojují. Dále je zapotřebí napojení na počítač s ovládacím programem, který také zpracovává a ukládá výsledky měření.




**Obr. 1:** *Schéma přístroje SIA. Pístová pumpa aspiruje stanovený objem vzorku a reakčních činidel do mísící cívky, kde dojde ke tvorbě detekovatelného produktu. Následuje obrácení pohybu pístu pumpy, přepnutí selekčního ventilu a produkt je puštěn do měřící cely detektoru a poté do odpadu. Převzato a upraveno ze zdroje* (2).

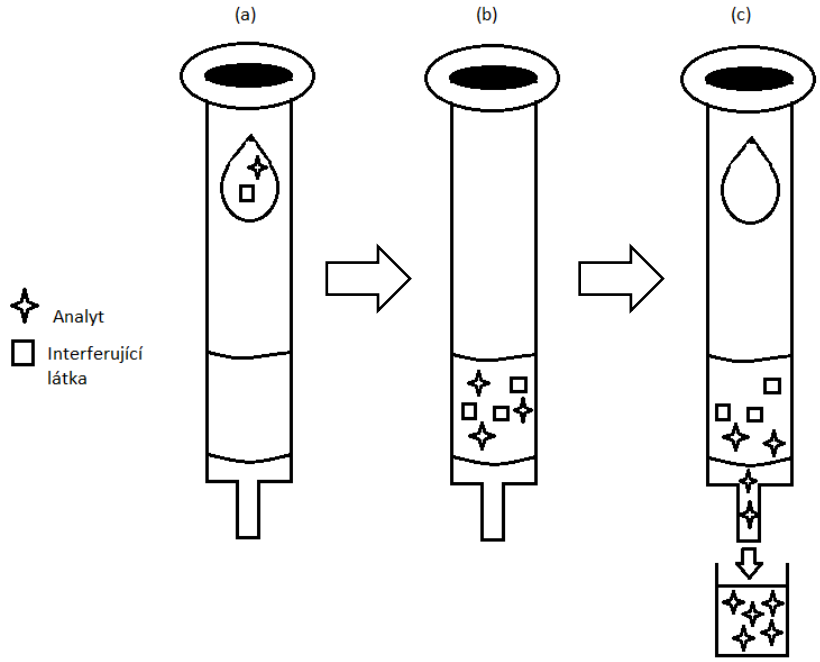
### 3.1.2 Lab-on-valve uspořádání

Koncept uspořádání lab-on-valve je miniaturizací výše představené metody. Miniaturizace byla umožněna začleněním kanálků pro přívod reagencií a vzorku, detekční cely a optických vláken na plochu plastového transparentního modulu. Optická vlákna vedoucí z detekční cely jsou napojena na zdroj světla a na detektor. V závislosti na uspořádání optických vláken a zvolené analytické reakci lze měřit buď absorbanci nebo fluorescenci. S tímto uspořádáním rovněž souvisí použití menších objemů vzorku a činidel, a tudíž i snížení objemu odpadu (2), (3).

## 3.2 Podporovaná kapalinová extrakce

Podporovaná kapalinová extrakce (Supported Liquid Extraction, SLE) byla vyvinuta při odstraňování nevýhod běžně používané extrakce z kapaliny do kapaliny (Liquid-liquid Extraction, LLE). Nevýhodou LLE je tvorba kapiček emulze, které se vytváří na rozhraní dvou nemísitelných kapalin při necitlivém zacházení s dělící nálevkou či jinou nádobou, ve které extrakce probíhá. Kapičky emulze obsahují analyt, který je z této formy velmi obtížně oddělován a při následném stanovení tudíž dochází ke zjištění falešně nižší koncentrace analytu. Ke ztrátám analytu dochází též při neúplném odběru organické fáze, která obsahuje již extrahovaný analyt. Uvedené skutečnosti činí z LLE poměrně těžko automatizovatelnou metodu (4), (5).

Proces SLE probíhá v plastové koloně, která je ve spodní části naplněna křemičitanovým sorbentem ohraničeným fritami. Kolona je na spodním konci uzpůsobena k odtékání vzorku do sběrné nádoby. Sorbent s látkami obsaženými v naneseném roztoku nijak nereaguje, jedná se pouze o inertní nosič zajišťující vytvoření tenké vrstvy roztoku na povrchu. Částečky sorbentu mnohonásobně zvětšují užitný povrch, na kterém dochází k vlastní extrakci. Vodný roztok vzorku obsahující analyt je nanesen na kolonu, kde během doby 5-10 minut (u některých aplikací i o něco déle) dojde k adsorpci celého objemu roztoku na sorbent. Před nanesením roztoku na kolonu je vhodné upravit jeho pH, aby analyt zůstal v neionizované formě a bylo možné jej extrahovat. Poté je na kolonu nanesen objem organického rozpouštědla a v průběhu prostupování tohoto elučního činidla kolonou dochází k přechodu analytu do organické fáze. Eluční činidlo není sorbentem zadržováno a následně odtéká z kolony do sběrné nádoby, a to buď samostatně vlivem gravitace nebo za použití pulzu vakua pro vzorky s větší viskozitou. Ostatní složky vzorku zůstávají zachyceny na sorbentu v koloně (4), (6), (7).




**Obr. 2:** *Schéma provedení podporované kapalinové extrakce. (a) nanesení vzorku na kolonu, (b) adsorpce celého objemu vzorku na sorbent, (c) přidání elučního činidla a vymývání analytu.*

Původně používaným sorbentem byla křemelina – hornina tvořená zkamenělými schránkami jednobuněčných řas rozsivek a dalšími anorganickými příměsmi. Vzhledem ke skutečnosti, že se jedná o přírodní materiál, je nasnadě, že hornina z každého naleziště bude mít odlišné vlastnosti. Z tohoto důvodu byla křemelina v laboratořích některých výrobců (např. Phenomenex) nahrazena syntetickým sorbentem, který by měl odstranit nevýhody spojené s použitím přírodního materiálu (8).

Kromě výše uvedených jednotlivých kolon existují také 48místné či 96místné destičky o různém obsahu sorbentu, které lze využít pro širokou škálu dávkovaných objemů. Rovněž je dostupný samotný sorbent, pro výrobu vlastního extrakčního vybavení. (6), (7).

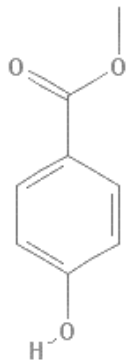
## 3.3 Chemické vlastnosti testovaných látek

Pro praktickou část této diplomové práce byly vybrány následující látky, u kterých byly zkoušeny různé parametry extrakčních podmínek s cílem optimalizovat tyto podmínky pro co nejvyšší míru extrakce.

Vybrány byly látky polární a seřazeny zde jsou dle míry jejich lipofility vyjádřené zlogaritmovanou hodnotou rozdělovacího koeficientu (log P). Rozdělovací koeficient vyjadřuje míru rozdílu v rozpustnosti dané sloučeniny ve dvou vzájemně nemísitelných fázích, například oktanol/voda. Čím vyšší je hodnota rozdělovacího koeficientu, tím je sloučenina více lipofilní a naopak, čím je hodnota rozdělovacího koeficientu nižší, tím více jsou hydrofilní (9).

**Methylparaben**

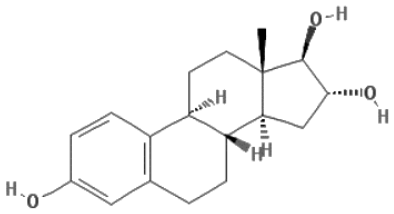
Systematický název podle IUPAC: Methyl-4-hydrdoxybenzoát
Skupenství: bílý krystalický prášek
Rozpustnost: ve vodě, methanolu a ethanolu
logP 1,96
$pK_a$ 8,5
$UV_{max}$ 296 nm
Strukturní vzorec:




**Obr. 3***: Strukturní vzorec methylparabenu, dostupné z (10).*

**Estriol**

Systematický název podle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,16R,17R) -13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,16,17-triol
Skupenství: bílý prášek
Rozpustnost: špatně rozpustný ve vodě, lépe v organických rozpouštědlech
logP 2,45
$pK_a$ 10,54
$UV_{max}$ 280nm
Strukturní vzorec:

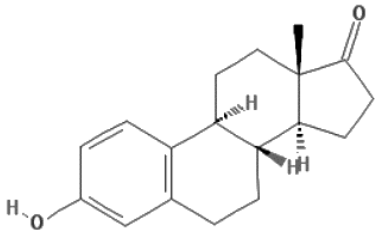


**Obr. 4:** *Strukturní vzorec estriolu, dostupné z (10).*

**Estron**

Systematický název podle IUPAC: (8R,9S,13S,14S) -3-hydroxy-13-methyl-7,8,9,11,12,14,15,16-octahydro-6H-cyclopenta[a]phenanthren-17-one
Skupenství: bílý prášek
Rozpustnost: špatně rozpustný ve vodě, mírně rozpustný v ethanolu, lépe v ostatních organických rozpouštědlech
logP 3,15
$pK_a$ 10,77 (11)
$UV_{max}$ 198nm

Strukturní vzorec:



**Obr. 5:** *Strukturní vzorec estronu, dostupné z (10).*

**Butylparaben**

Systematický název podle IUPAC: Butyl-4-hydroxybenzoát

Skupenství: bílý krystalický prášek

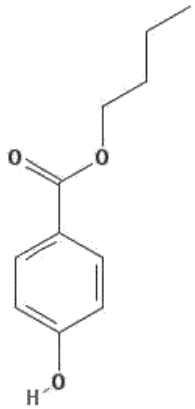
Rozpustnost: málo rozpustný ve vodě, dobře rozpustný v organických rozpouštědlech (12).

logP 3,57

$pK_a$ 8,47

$UV_{max}$ 256nm

Strukturní vzorec:



***Obr. 6:*** *Strukturní vzorek butylparabenu, dostupné z (10).*

**β-estradiol**

Systematický název podle IUPAC: (8R,9S,13S,14S,17S) -13-methyl-6,7,8,9,11,12,14,15,16,17-decahydrocyclopenta[a]phenanthrene-3,17-diol

Skupenství: bílý krystalický prášek

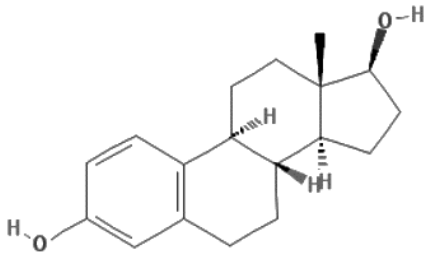
Rozpustnost: špatně rozpustný ve vodě, lépe rozpustný v acetonu, ethanolu, dioxanu

logP 4,01

$pK_a$ 10,71 (11)

UV max. 225, 280nm

Strukturní vzorec:




***Obr.*** *7: Strukturní vzorec β-estradiolu, dostupné z (10).*

**Sudan I**

Systematický název dle IUPAC: (1Z) -1-(phenylhydrazinylidene) naphthalen-2-one

Skupenství: červená pevná látka

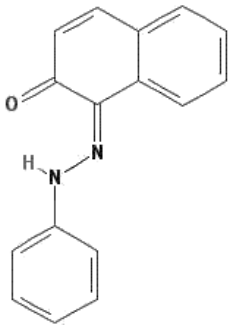
Rozpustnost: nerozpustné ve vodě, rozpustné v organických rozpouštědlech (ethanol, aceton)

Log P 4,24 (13)

pKa 11,65

$UV_{max}$ 418 nm, 476 nm (14)

Strukturní vzorec:




**Obr. 8***: Strukturní vzorec Sudan I, dostupné z (10).*

**Sudan II**

Systematický název dle IUPAC:

(1Z) -1-[(2,4-dimethylphenyl) hydrazinylidene] naphthalen-2-one

Skupenství: červená pevná látka

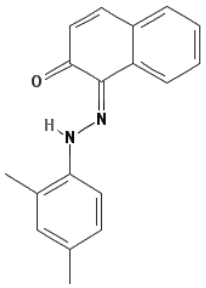
Rozpustnost: nerozpustné ve vodě, rozpustné v organických rozpouštědlech (ethanol, aceton, benzen)

Log P 5,16 (15)

pKa 11,65

$UV_{max}$ 493 nm, 604 nm (16)

Strukturní vzorec:




**Obr. 9:** *Strukturní vzorec Sudan II, dostupné z (10).*

**Sudan IV**

Systematický název dle IUPAC: (1Z) -1-[[2-methyl-4-[(2-methylphenyl) diazenyl] phenyl] hydrazinylidene] naphthalen-2-one

Skupenství: červená pevná látka

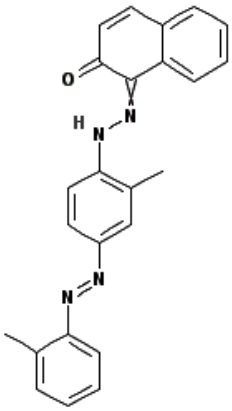
Rozpustnost: nerozpustné ve vodě, rozpustné v organických rozpouštědlech (ethanol, aceton, benzen)

Log P 6,657 (17)

pKa 11,7

$UV_{max}$ 357 nm, 520 nm (18)

Strukturní vzorec:




**Obr. 10**: *Strukturní vzorec Sudan IV, dostupné z (10).*

**Cholekalciferol**

Systematický název podle IUPAC: (1S,3Z) -3-[(2E) -2-[(1R,3aS,7aR) -7a-methyl-1-[(2R) -6-methylheptan-2-yl] -2,3,3a,5,6,7-hexahydro-1H-inden-4-ylidene] ethylidene] -4-methylidenecyclohexan-1-ol

Skupenství: světlý prášek

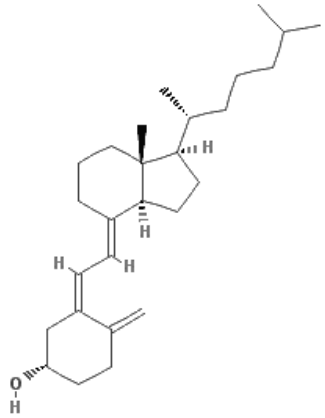
Rozpustnost: nerozpustný ve vodě

logP 7,5

$pK_a$ 18,38 (19)

$UV_{max}$. 373

Strukturní vzorec:



**Obr. 11:** *Strukturní vzorec cholekalciferolu, dostupné z (10).*

**α-tokoferol**

Systematický název podle IUPAC: (2R) -2,5,7,8-tetramethyl-2-[(4R,8R) -4,8,12-trimethyltridecyl] -3,4-dihydrochromen-6-ol

Skupenství: žlutá olejová kapalina

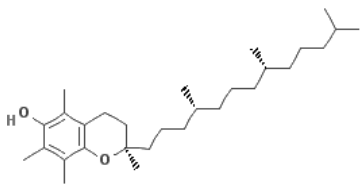
Rozpustnost: nerozpustný ve vodě, méně rozpustný v ethanolu, lépe v organických rozpouštědlech

logP 10,0

$pK_a$ 10,8

UV max. 292 nm (20)

Strukturní vzorec:



**Obr. 12:** *Strukturní vzorec α-tokoferolu, dostupné z (10).*

Výše uvedené údaje o použitých látkách jsou dostupné z (22) – (31).

# 4. Experimentální část

## 4.1 Použité přístroje a pomůcky

- Průtokový systém miniSIA-2 (GlobalFIA, USA) – dvě kontinuální pumpy MilliGAT HiFlow s mísícími cívkami – v práci využita jedna (S2), hybridní selekční ventil pro použití v SIA a FIA módu (VICI, USA), průtoková Z cela detektoru (FIAlab, USA), detektor USB4000 (Ocean Optics, USA), zdroj UV-VIS DH-2000 (Ocean Optics, USA), optická vlákna pro UV-VIS s průměrem 600 µm (FIAlab, USA), hadičky o vnitřním průměru 0,5 a 0,75 mm, teflon (Idex, USA), počítač vybavený software FloZF (GlobalFIA, USA).
- Kolona SLE se sorbentem Phenomenex Novum™ SLE o rozměrech 10x2,5 mm, uzpůsobená pro zapojení do průtokového systému
- Kolona SPE se sorbentem C18 o rozměrech 10x1,6 mm, uzpůsobená pro zapojení do průtokového systému
- Analytické váhy Sartorius Analytic A200S
- Digitální pH metr Hanna instruments pH 212
- Ultrazvuková lázeň Sonorex Bandelin RK-100
- Automatické pipety 10–100 µl, 100–1000 µl, 1–10 ml
- Odměrný válec Simax, 100 ml
- Kádinky Simax, 100 ml
- Skleněné uzavíratelné lahve Fisherbrand 100 a 250 ml
- Zkumavky Eppendorf 2 ml
- Centrifugační zkumavky s uzávěrem plastové 15 ml a 50 ml

## 4.2 Použité chemikálie

- Methylparaben (Sigma-Aldrich)
- Butylparaben (Sigma-Aldrich)
- Cholekalciferol ≥98 % (Sigma-Aldrich)
- α-tokoferol ≥96 % (Sigma-Aldrich)
- Estradiol ≥98 % (Sigma-Aldrich)
- Estriol ≥97 % (Sigma-Aldrich)
- Estron ≥99 % (Sigma-Aldrich)
- Sudan I ≥95 % (Sigma-Aldrich)
- Sudan II 90 % (Sigma-Aldrich)
- Sudan IV ≥80 %, (Sigma-Aldrich)
- Chlorid sodný 99,9 % (Penta)
- Octan amonný ≥ 98 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina octová ≥ 99,7 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina chlorovodíková 37 % (Sigma-Aldrich)
- Kyselina mravenčí ≥95 (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid amonný 28–30 % (Sigma-Aldrich)
- Ethanol 95 % (Penta)
- Methanol Chromasolv gradient grade (Sigma-Aldrich)
- Acetonitril Chromasolv gradient grade (Sigma-Aldrich)
- Superčistá voda (Millipore Merck)

## 4.3 Použité zásobní roztoky

- Methylparaben (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do odměrné baňky o objemu 25 ml.
- Butylparaben (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do odměrné baňky o objemu 25 ml.
- Vitamin D3 – cholekalciferol (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky z tmavého skla o objemu 5 ml.
- Vitamin E–α-tokoferol (2 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 1,5 ml.
- β-estradiol (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do objemu 2 ml.
- Estriol (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 2 ml.
- Estron (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 2 ml.
- Sudan I (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 2 ml.
- Sudan II (1mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 2 ml.
- Sudan IV (1 mg/ml): navážka rozpuštěna v methanolu do vialky o objemu 2 ml.
- Chlorid sodný (10 g/l) navážka byla rozpuštěna ve 100ml ultračisté vody.
- Methanol 1 %, 5 %, 20 % a 30 % roztok. Methanol byl naředěn na požadované koncentrace vodou.
- Kyselina mravenčí (1 %) byla naředěna ultra čistou vodou do 100 ml.
- Octan amonný (0,2M) byl naředěn ultra čistou vodou do 100 ml.
- Hydroxid amonný (0,5M) byl naředěn ultra čistou vodou do 100 ml.
- Kyselina chlorovodíková (pH 1) byla připravena naředěním koncentrované kyseliny vodou s použitím pH metru.

Dále byly připraveny roztoky ethanolu, methanolu a acetonitrilu jakožto eluční a nosná činidla podle níže uvedené tabulky. Tyto roztoky byly připraveny do 100ml skleněné lahve se šroubovacím víčkem. Chemikálie i ultra čistá voda byly odměřovány pomocí odměrného válce.

**Tab. 1:** Zásobní roztoky elučních činidel a nosných roztoků

| **Eluční činidlo** | 100 % ethanol | 100 % methanol | 100 % acetonitril |
|---|---|---|---|
| **Nosný roztok** | 10 % ethanol | 10 % methanol | 10 % acetonitril |

## 4.4 Použité pracovní roztoky a jejich příprava

Na níže uvedených pracovních roztocích byla provedena experimentální metoda on-line SLE extrakce. Pracovní roztoky methylparabenu a butylparabenu jsou zde v tabulkách uvedeny společně, neboť pro experiment byly připraveny pracovní roztoky o shodných koncentracích. Tyto roztoky byly připraveny do plastových zkumavek o objemu 15 ml dle návodu v tabulce. Pro přípravu koncentrací od 0,1 µg/ml níže byl připraven pracovní roztok o koncentraci 10 µg/ml z důvodu vyšší přesnosti pipetování.

**Tab. 2**: Příprava pracovních roztoků pro methylparaben a butylparaben

| **Příprava pracovních roztoků methylparabenu a butylparabenu** | | |
|---|---|---|
| **Koncentrace pracovního roztoku** | **Zásobní roztok (c = 1 mg/ml)** | **10 % methanol** |
| 10 µg/ml | 0,150 ml | 14,85 ml |
| 5 µg/ml | 0,075 ml | 14,925 ml |
| 1 µg/ml | 0,015 ml | 14,985 ml |
| 0,2 µg/ml | 0,003 ml | 14,997 ml |
| **Příprava pracovních roztoků methylparabenu a butylparabenu** | | |
| **Koncentrace** | **Zásobní roztok (c = 10 µg/ml)** | **10 % methanol** |
| 0,1 µg/ml | 0,15 ml | 14,85 ml |
| 0,05 µg/ml | 0,075 ml | 14,925 ml |
| 0,025 µg/ml | 0,0375 ml | 14,963 ml |

Pracovní roztoky cholekalciferolu byly připraveny pipetováním příslušného objemu, který je uveden v tabulce, zásobního roztoku do plastových zkumavek o objemu 15ml

a doplněny 10 % methanolem. Pro přípravu koncentrací od 1 µg/ml níže byl připraven nový zásobní roztok o koncentraci 10 µg/ml z důvodu vyšší přesnosti při pipetování.

**Tab. 3:** Příprava pracovních roztoků cholekalciferolu.

| **Pracovní roztoky cholekalciferolu** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Zásobní r. (1 mg/ml)** | **10 % methanol** | **Koncentrace** | **Zásobní r. (10µg/ml)** | **10 % methanol** |
| 10 µg/ml | 0,150 ml | 14,85 ml | 1 µg/ml | 1,5 ml | 13,5 ml |
| 2,5 µg/ml | 0,0375 ml | 14,963 ml | 0,5 µg/ml | 0,750 ml | 14,25 ml |
| 2 µg/ml | 0,030 ml | 14,97 ml | 0,1 µg/ml | 0,150 ml | 14,85 ml |

Pracovní roztoky α-tokoferolu byly připraveny do plastových zkumavek o objemu 2 ml. Pro přípravu koncentrací od 5 µg/ml níže byl připraven nový zásobní roztok o koncentraci 20 µg/ml z důvodu vyšší přesnosti při pipetování.

**Tab. 4:** Příprava pracovních roztoků α-tokoferolu.

| **Pracovní roztoky α-tokoferolu** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Požadovaná koncentrace** | 20 µg/ml | | 10 µg/ml | |
| **Zásobní r. (2mg/ml)** | 0,020 ml | | 0,010 ml | |
| **10 % methanol do 2 ml** | 1,98 ml | | 1,99 ml | |
| **Požadovaná koncentrace** | 5 µg/ml | 1 µg/ml | 0,25 µg/ml | 0,125 µg/ml |
| **Zásobní r. (20 µg/ml)** | 0,500 ml | 0,100 ml | 0,025 ml | 0,0125 ml |
| **10 % methanol do 2 ml** | 1,5 ml | 1,9 ml | 1,975 ml | 1,9875 ml |

Pracovní roztoky β-estradiolu, estriolu a estronu byly připraveny do plastových zkumavek o objemu 2 ml dle následující tabulky.

**Tab. 5:** Příprava pracovních roztoků estrogenů.

| **Pracovní roztoky β-estradiolu, estriolu a estronu** | | |
|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Zásobní roztok (1 mg/ml)** | **Ředící roztok** |
| 200 µg/ml | 0,400 ml | 1,6 ml kys. mravenčí |
| | 0,400 ml | 1,6 ml octan amonný |
| | 0,400 ml | 1,6 ml hydroxid amonný |
| 100 µg/ml | 0,200 ml | 1,8 ml kys. mravenčí |
| | 0,200 ml | 1,8 ml octan amonný |
| | 0,200 ml | 1,8 ml hydroxid amonný |
| 50 µg/ml | 0,100 ml | 1,9 ml kys. mravenčí |
| | 0,100 ml | 1,9 ml octan amonný |
| | 0,100 ml | 1,9 ml hydroxid amonný |
| **Koncentrace estriolu** | **Zásobní roztok (1 mg/ml)** | **Kys. chlorovodíková (pH 1)** |
| 100 µg/ml | 0,200 ml | 1,8 ml |
| 50 µg/ml | 0,100 ml | 1,9 ml |

| **Pracovní roztoky β-estradiolu v kyselině mravenčí pro tvorbu kalibrační křivky** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Zásobní roztok (1 mg/ml)** | **1 % kys. mravenčí** | **Koncentrace** | **Zásobní roztok (1 mg/ml)** | **1 % kys. mravenčí** |
| 10 µg/ml | 0,020 ml | 1,98 ml | 75 µg/ml | 0,150 ml | 1,85 ml |
| 25 µg/ml | 0,050 ml | 19,5 ml | 100 µg/ml | 0,200 ml | 1,8 ml |
| 50 µg/ml | 0,100 ml | 1,9 ml | 125 µg/ml | 0,250 ml | 1,75 ml |

## 4.5 Výběr rozpouštědla

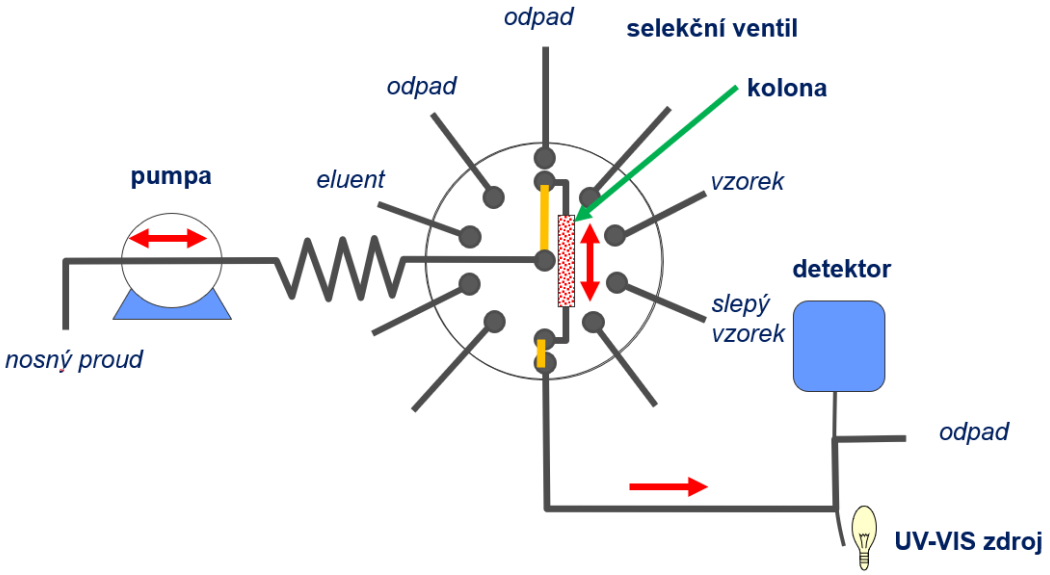
Cílem prvních měření byl výběr vhodné kombinace nosného proudu a elučního činidla. Pro tento účel byly připraveny pracovní roztoky methylparabenu a butylparabenu o koncentraci 10 μg/ml naředěné 10 % methanolem. Dávkovaný objem vzorku byl 50 μl. Tyto pracovní roztoky byly následně extrahovány v následujících podmínkách.

**Tab. 6:** Pracovní roztoky roztoků elučních činidel a nosných proudů.

| **Nosný proud** | 10 % methanol | 10 % ethanol | 10 % acetonitril |
|---|---|---|---|
| **Eluční činidlo** | 100 % methanol | 100 % ethanol | 100 % acetonitril |

## 4.6 Průběh měření

Všechny látky uvedené na následujících stranách byly extrahovány z pracovních roztoků. Extrakce probíhala metodou SIA se začleněnou SLE kolonou (viz Obr. 13) většinou v režimu straightflush, tzn. dávkování vzorku na kolonu i jeho následná eluce probíhaly ve stejném směru. Některé experimenty byly proměřeny také v režimu backflush, kdy dávkování vzorku na kolonu probíhalo jedním směrem a jeho následná eluce probíhala v opačném směru (a dále do průtokové cely detektoru). Detekce byla prováděna spektrofotometricky (UV-VIS). Rozsah snímaných vlnových délek byl stanoven na 256–630 nm. Výchozí extrakční podmínky jsou vždy uvedeny v tabulce pro každý jednotlivý experiment. Kombinace 10 % a 90 % methanolu byla vybrána za základě výsledků předešlých měření na methylparabenu a butylparabenu jako vhodná. Eluční činidlo bylo aplikováno v objemu 700 µl. V příloze práce je uveden program, který byl používán pro extrakce uvedených látek.




**Obr. 13:** *Schéma sestavy SIA a SLE.*

V reakci na první provedený experiment s každou látkou byly výchozí podmínky upravovány s cílem dosáhnout co nejvyšší efektivity extrakce dané látky. Rovněž použitý program byl postupně doplňován a upravován s cílem zvýšit efektivitu extrakce.

Extrakce probíhaly v sérii po dvou či třech měřeních. V experimentech, které se zabývaly opakovatelností metody, byly vybrané koncentrace proměřeny minimálně šestkrát po sobě.

Praktickou část této práce lze rozdělit na dvě skupiny experimentů. V první skupině byla zjišťována efektivita extrakce při proměně extrakčních parametrů. Testována byla změna rozpouštědla vzorku, dávkované množství vzorku, rychlost nástřiku vzorku na kolonu, časový interval vhodný pro adsorpci vzorku na sorbent kolony a přídavek chloridu sodného. Ve druhé skupině jsou uvedeny experimenty, u kterých byly vybrány nejvhodnější extrakční parametry a byly proměřeny kalibrační křivky a zjišťována opakovatelnost metody.

### 4.6.1 Optimalizace parametrů

Experiment 1: Vliv přídavku chloridu sodného ke vzorku

Do pracovních roztoků methylparabenu, butylparabenu a sudanu II bylo přidáno množství 1 % chloridu sodného z důvodu zvýšení iontové síly roztoku a zvýšení afinity analytu k sorbentu. V případě parabenů byl NaCl přidán v poměru 1:1 vzhledem k množství parabenu. K pracovním roztokům sudanu II bylo přidáno 500 µl NaCl. Extrakční podmínky jsou uvedeny v tabulce.

**Tab. 7:** Extrakční podmínky methylparabenu a butylparabenu.

| **Methylparaben, butylparaben – extrakční podmínky** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 1 µg/ml<br>10 µg/ml | SLE | 50 µl | 10 % methanol | 100 % ethanol | Straightflush | 10 µl/s |
| **Sudan II extrakční podmínky** | | | | | | |
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost** |
| 5 µg/ml<br>10 µg/ml<br>20 µg/ml | SLE | 250 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s |

Experiment 2: Vliv složení rozpouštědla pracovních roztoků

Cílem následujících experimentů bylo zjistit, jaký vliv na extrakci bude mít příprava pracovního roztoku v jiném než 10 % methanolu. Pro tyto pokusy byly vybrány látky sudan I a α-tokoferol. Extrakční podmínky jsou uvedeny níže. Původní pracovní roztoky byly připraveny v 10 % methanolu.

**Tab. 8**: Extrakční podmínky sudanu I a α-tokoferolu.

| **Sudan I – extrakční podmínky** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 5 µg/ml | SLE | 250 µl | 1 %, 5 %, 10%, 20 %, 30%methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s |
| **α – tokoferol – extrakční podmínky** | | | | | | |
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 1 µg/ml | SLE | 250 µl | 5 %, 30 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s |

Experiment 3: Vliv rychlosti nanesení vzorku na kolonu

Dalším významným parametrem pro efektivitu extrakce je rychlost dávkování vzorku na kolonu. V původním programu byla zadána rychlost 10 µl/s. Na pracovních roztocích cholekalciferolu a α-tokoferolu byl vyzkoušen vliv snížení této rychlosti dle následujících parametrů.

**Tab. 9:** Extrakční podmínky cholekalciferolu a α-tokoferolu.

| **Cholekalciferol – extrakční podmínky** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 1 µg/ml<br>10 µg/ml | SLE | 100 µl | 10 % methanol | 100 % methanol | Straightflush | 5 µl/s<br>3 µl/s<br>1 µl/s |
| **α-tokoferol – extrakční podmínky** | | | | | | |
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 5 µg/ml | SLE | 250 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 5 µl/s<br>1 µl/s |

Experiment 4: Vliv časový interval pro adsorpci vzorku na kolonu

V předchozích experimentech nebyl v programu ponechán žádný časový interval, kdy byl zastaven tok pro lepší adsorpci vzorku na sorbent kolony. Proto bylo dalším měněným parametrem přidání příkazu „wait“ do extrakčního programu ihned po nanesení vzorku na kolonu. Cílem této série měření bylo nalezení optimálního časového intervalu, během kterého dojde k adsorpci, ale zároveň nebude zbytečně prodlužována doba trvání extrakce Testovány byly pracovní roztoky α-tokoferolu podle následujících podmínek.

Dodržení daného časového intervalu je doporučováno u všech komerčně vyráběných kolon. Délka doporučeného intervalu je odvíjena od množství naneseného vzorku a množství sorbentu v koloně. Velmi také záleží na viskozitě vzorku (21).

**Tab. 10:** Extrakční podmínky α-tokoferolu.

| **α-tokoferol – extrakční podmínky** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** | **Časový interval** |
| 5 µg/ml<br>10 µg/ml<br>20 µg/ml | SLE | 250 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s | 60 s |
| 20 µg/ml | SLE | 250 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s | 60 s,<br>120 s,<br>180 s,<br>240 s |
| 20 µg/ml | SLE | 250 µl | 1 % kys. mravenčí | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s | 60 s,<br>120 s,<br>180 s,<br>240 s |

Experiment 5: Vliv objemu vzorku dávkovaného na kolonu

Velmi důležitým parametrem, kterému byla věnována značná část experimentů, je optimální objem vzorku dávkovaný na kolonu. Vzhledem k tomu, že původní komerčně dostupná kolona byla upravena, nebylo tak možné použít předepsané objemy doporučené výrobcem. Experimentálně byly vyzkoušeny různé objemy na látkách butylparaben, cholekalciferol a α-tokoferol. Extrakční podmínky pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tabulkách.

**Tab. 11:** Extrakční podmínky butylparabenu a cholekalciferolu.

| **Butylparaben – extrakční podmínky** | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 10 µg/ml | SPE SLE | 50, 100, 150, 200, 250, 300 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush, Backflush | 10 µl/s |
| 1 µg/ml | SPE | 250, 500, 750 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush, Backflush | 10 µl/s |
| 1 µg/ml 10 µg/ml | SPE SLE | 100, 200, 300, 400, 500 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush, Backflush | 10 µl/s |
| **Cholekalciferol – extrakční podmínky** | | | | | | |
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost nástřiku** |
| 10 µg/ml | SLE | 50, 100, 150, 200, 400, 800 µl | 10 % methanol | 100 % methanol | Straightflush | 10 µl/s |
| 10 µg/ml | SLE | 50, 100, 150, 200, 250 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s |
| 1 µg/ml | SLE | 50, 100, 200 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 1 µl/s |

**Tab. 12:** Extrakční podmínky α-tokoferolu.

| **α-tokoferol – extrakční podmínky** | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace** | **Kolona** | **Objem vzorku** | **Ředící roztok** | **Eluce** | **Směr** | **Rychlost** | **Čas** |
| 20 µg/ml | SLE | 50, 100, 150 µl | 10 % methanol | 90 % methanol | Straightflush | 1 µl/s | 120 s |
| 20 µg/ml | SLE | 50, 100, 150, 200, 250, 500 µl | 1 % kys. mravenčí | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s | 120 s |
| 5 µg/ml | SLE | 250, 500, 750, 1000 µl | 1 % kys. mravenčí | 90 % methanol | Straightflush | 10 µl/s | 0 s |

### 4.6.2 Kalibrační křivky a opakovatelnost

Po prozkoušení parametrů uvedených v předchozí podkapitole byla uskutečněna měření vzorků s cílem sestavit kalibrační křivky a stanovit opakovatelnost extrakční metody. Kalibrační křivky byly proměřeny pro následující látky: sudan I, sudan II, sudan IV, vitamin E, β-estradiol, estriol a estron. Extrakční podmínky pro všechny uvedené látky jsou uvedeny v následující tabulce.

**Tab. 13:** Extrakční podmínky pro tvorbu kalibračních křivek.

| Kolona | Objem vzorku | Rychlost nástřiku | Eluční činidlo | Směr eluce | Připraveno v |
|---|---|---|---|---|---|
| SLE | 250 µl | 10 µl/s | 90 % methanol | Straightflush | 10 % methanol |

Za těchto extrakčních podmínek byly v prvním pokusu proměřeny koncentrace sudanu I, II a IV a α-tokoferolu. Během měření bylo zjištěno, že vyšší koncentrace (10µg/ml, 20 µg/ml) α-tokoferolu protékají systémem bez zadržení na koloně, proto byly následně proměřeny nižší koncentrace.

**Tab. 14:** Měřené koncentrace sudanu I, II, IV a α-tokoferolu.

| | Sudan I, II, IV | α-tokoferol | |
|---|---|---|---|
| **Koncentrace µg/ml** | 0 | 0 | 0 |
| | 5 | 5 | 0,125 |
| | 10 | 10 | 0,25 |
| | 20 | 20 | 0,5 |
| | neměřeno | neměřeno | 1 |

Vzhledem k výsledkům, získaných měřením sudanů z tabulky č.14 byly pro další experimenty použity roztoky jiných látek. V kyselém, neutrálním a bazickém prostředí (namísto původně použitého 10 % methanolu) byly připraveny pracovní roztoky β-estradiolu, estriolu, estronu a α-tokoferolu podle níže uvedených Tab. 15 a Tab. 16. Ostatní extrakční parametry zůstaly zachovány.

Koncentrace pracovních roztoků estrogenů nižší než 50 µg/ml byly příliš nízké, aby jejich eluce byla zaznamenána detektorem. Naopak koncentrace vyšší než 100 µg/ml vykazovaly vznik sraženin. Sraženiny se nepodařilo rozpustit ani v ultrazvukové lázni, pročež nebyly tyto nejvyšší koncentrace zahrnuty do měření, aby nedošlo k usazení sraženin uvnitř systému. Z tohoto důvody byly pro proměření připraveny roztoky β-

estradiolu, estriolu a estronu o koncentracích 50 µg/ml a 100 µg/ml, jejichž eluci byl detektor schopen zaznamenat a zároveň nedocházelo ke srážení vzorků.

**Tab. 15:** Pracovní roztoky estrogenů pro tvorbu kalibračních křivek.

| **β-estradiol, estriol, estron** | | | |
|---|---|---|---|
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 50 | 100 |
| **Ředící roztok** | 1 % kyselina mravenčí | | |
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 50 | 100 |
| **Ředící roztok** | 0,2M octan amonný | | |
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 50 | 100 |
| **Ředící roztok** | 0,5M hydroxid amonný | | |

**Tab. 16:** Pracovní roztoky pro tvorbu kalibračních křivek.

| **α-tokoferol** | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 5 | 10 | 20 |
| **Ředící roztok** | 1 % kyselina mravenčí | | | |
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 5 | 10 | 20 |
| **Ředící roztok** | 0,2M octan amonný | | | |
| **Koncentrace (µg/ml)** | 0 | 5 | 10 | 20 |
| **Ředící roztok** | 0,5M hydroxid amonný | | | |

Na základě výsledků roztoku β-estradiolu v kyselině mravenčí byla připravena nová řada pracovních roztoků s větším rozsahem koncentrací pro tvorbu přesnější kalibrační křivky. Uvedené vzorky byly proměřeny na obou kolonách a v obou směrech eluce vzorku z kolony. Do programu byl zařazen promývací krok před vlastním nástřikem, který odebral ze vzorku objem 25 µl, čímž došlo k promytí hadičky, poté byl puštěn do odpadu.

**Tab. 17:** Koncentrace β-estradiolu pro tvorbu kalibrační křivky.

| **Koncentrace β-estradiolu (µg/ml)** | 0 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | 125 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|

Extrakční podmínky pro tvorbu kalibrační křivky β-estradiolu jsou uvedeny v tabulce č.18.

**Tab. 18:** Extrakční podmínky pro tvorbu kalibrační křivky β-estradiolu.

| Kolona | Objem vzorku | Rychlost nástřiku | Eluční činidlo | Směr eluce | Připraveno v | Časový interval |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SLE | 250 µl | 10 µl/s | 90 % methanol | Straightflush Backflush | 10 % methanol | 120 s |
| SPE | 250 µl | 10 µl/s | 90 % methanol | Straightflush | 10 % methanol | 120 s |

Opakovatelnost

Opakovatelnost zkoumané metody byla proměřena na látkách β-estradiol a butylparaben. Na butylparabenu byla zjišťována opakovatelnost metody při použití SPE sorbentu, na β-estradiolu byla zjišťována opakovatelnost při použití SPE i SLE sorbentu. Každý pracovní roztok butylparabenu byl změřen ve dvou sériích, přičemž každá série obsahovala tři měření. Stejný způsob sběru dat byl použit i pro β-estradiol. Situace, kdy se počet měření v sérii lišil, jsou uvedeny v příslušné tabulce. Míra opakovatelnosti byla určena relativní směrodatnou odchylkou. Hranice přijatelnosti byla stanovena na 10 %. V tabulkách níže jsou uvedeny extrakční podmínky.

**Tab. 19:** Extrakční podmínky pro zjištění opakovatelnosti butylparabenu a β-estradiolu.

| **Butylparaben 1 µg/ml – extrakční podmínky** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kolona** | **Objem vzorku** | **Rychlost nástřiku** | **Eluční činidlo** | **Směr eluce** | **Připraveno v** |
| SPE | 250, 500, 1000 µl | 10 µl/s | 90 % methanol | Straightflush Backflush | 10 % methanol |
| **β-estradiol (10 µg/ml, 50 µg/ml, 125 µg/ml) v 1 % kyselině mravenčí** | | | | | |
| **Kolona** | **Objem vzorku** | **Rychlost nástřiku** | **Eluční činidlo** | **Směr eluce** | **Připraveno v** |
| SLE<br>SPE | 250 µl | 10 µl/s | 90 % methanol | Straightflush Backflush | 10 % methanol |

Roztoky β-estradiolu byly proměřeny podle následující tabulky. Od třetího měření byl přidán promývací krok o objemu 25 µl. Rovněž zde byly proměřovány oba směry eluce vzorku z kolony.

**Tab. 20:** Měření opakovatelnosti u jednotlivých koncentrací β-estradiolu.

| **Měření** | **Počet měření** | | | **Směr** | **Způsob sběru dat** |
|---|---|---|---|---|---|
| | 10 µg/ml | 50 µg/ml | 125 µg/ml | | |
| 1. | 6x | 6x | 6x | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 2. | - | 9x | - | Straightflush | 1 série o 9 měřeních |
| 3. | - | 6x | - | Straightflush | 1 série o 6 měřeních |
| 4. | 6x | 6x | 6x | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 5. | 6x | 6x | 6x | Backflush | 2 série po 3 měřeních |
| 6. | - | 6x | - | Straightflush | Samostatně |
| 7. | - | 6x | - | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 8. | - | 6x | - | Backflush | Samostatně |
| 9. | - | 6x | - | Backflush | 2 série po 3 měřeních |

Následně byly shodné roztoky extrahovány na koloně SPE ve směru straightflush vždy ve dvou sériích po třech měřeních.

**Tab. 21:** Hodnoty opakovatelnosti při použití SPE kolony.

| **Koncentrace** | 10 µg/ml | 50 µg/ml | 125 µg/ml |
|---|---|---|---|
| **RSD** | 3,41 % | 3,12 % | 66,07 % |

Lze konstatovat, že opakovatelnost metody pro koncentraci 10 µg/ml byla mnohem lepší po přidání promývacího kroku do systému. Naopak koncentrace 125 µg/ml vykazovala příliš vysokou hodnotu relativní směrodatné odchylky, a to jak při použití kolony pro SLE, tak i s použitím SPE. U koncentrace 50 µg/ml se přidání promývacího kroku projevilo pouze v režimu straightflush, kdy byla data sbírána ve dvou sériích, každá o třech měřeních. Při použití režimu backflush nedošlo ke zlepšení opakovatelnosti metody. Ovšem pro tuto koncentraci se jeví výhodnější použití kolony SPE.

# 5. Výsledky

Vybrané látky byly z pracovních roztoků extrahovány díky spojení podporované kapalinové extrakce a sekvenční injekční analýzy. Cílem práce bylo nalezení optimálních podmínek pro on-line extrakci těchto látek. V následujících podkapitolách je stručně shrnuto, jak se měnila absorbance v závislosti na měněných parametrech. Absorbance získané měřením pracovních roztoků byly porovnávány s absorbancemi slepých vzorků. U experimentů zjišťujících opakovatelnost je výsledek vyjádřen relativní směrodatnou odchylkou.

## 5.1 Optimalizace podmínek

Experiment 1: Přídavek chloridu sodného

Po proměření pracovních vzorků methylparabenu a butylparabenu lze konstatovat, že se přídavek NaCl v naměřených hodnotách absorbancí neprojevil a ke zlepšení extrakce nedošlo.

Proměřeny byly rovněž roztoky obou parabenů o objemech 100 µl a 150 µl, ale v průběhu měření s těmito objemy došlo ke zvýšení tlaku v systému a k protečení objemu nosného proudu se vzorkem skrze pojistný tlakový ventil. Proto byl do programu přidán příkaz „wait“ v trvání 5 vteřin, během kterého došlo k normalizaci tlaku v systému.

Hodnoty absorbance získané měřením sudanu II byly porovnány s absorbancemi vzorků o shodných koncentracích, avšak bez přidaného NaCl. Kromě koncentrace 20µg/ml nedošlo k výraznějším změnám absorbance, naopak absorbance vzorků s přidaným podílem NaCl vykázaly nižší hodnotu absorbance.

**Tab. 22:** Absolutní hodnoty absorbance sudanu II.

| Koncentrace (µg/ml) | bez NaCl | s NaCl |
|---|---|---|
| 20 | 1,1166 | 1,2924 |
| 10 | 0,4780 | 0,4675 |
| 5 | 0,3122 | 0,3077 |

Experiment 2: Příprava pracovních roztoků v různých koncentracích methanolu

Jak je patrné z Tab. 23, pracovní roztok připravený v desetiprocentním methanolu poskytl v případě sudanu I nejvyšší hodnotu absorbance. Proto byl zachován pro přípravu dalších pracovních roztoků právě desetiprocentní methanol.

**Tab. 23:** Absolutní hodnoty sudanu I připraveného v různých koncentracích methanolu.

| **Sudan I, 5 µg/ml** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Ředící roztok methanolu** | 1 % | 5 % | 10 % | 20 % | 30 % |
| **Absorbance** | 0,3975 | 0,4052 | 0,8249 | 0,3371 | 0,2199 |

V následující tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbancí získané měřením roztoku α – tokoferolu o koncentraci 1 µg/ml. Na rozdíl od experimentu se sudanem I, zde vykázal vzorek, připravený v 10 % methanolu nejnižší absorbanci. Nejvyšší hodnota absorbance byla zaznamenána u vzorku připraveného ve 30 % methanolu.

**Tab. 24:** Naměřené hodnoty absorbance α-tokoferolu v roztocích methanolu.

| **α – tokoferol, 1 µg/ml** | | | |
|---|---|---|---|
| **Ředící roztok methanolu** | 5 % | 10 % | 30 % |
| **Absorbance** | 0,1291 | 0,1207 | 0,1933 |

Experiment 3: Snížení rychlosti nanesení vzorku na kolonu

Po vyhodnocení naměřených hodnot absorbancí cholekalciferolu získaných měřením při rychlostech 5 µl/s, 3 µl/s a 1 µl/s nebylo patrné žádné zlepšení extrakce v porovnání s původní rychlostí 10 µl/s. Z tohoto důvodu byl program pro extrakci upraven tak, aby eluční činidlo bylo dávkováno postupně ve více menších objemech. Ani po této změně se účinnost extrakce neprojevila jako efektivnější.

**Tab. 25**: Naměřené hodnoty absorbance cholekalciferolu.

| **Cholekalciferol** | | |
|---|---|---|
| **Rychlost nástřiku (µl/s)** | **1 µg/ml** | **10 µg/ml** |
| 1 | 0,1103 | 0,1106 |
| 3 | 0,1039 | 0,1031 |
| 5 | 0,1099 | 0,1072 |
| 10 | 0,1311 | 0,1181 |

Snížení rychlosti nástřiku roztoku α-tokoferolu o koncentraci 5 µg/ml na kolonu vedlo k mírnému zlepšení extrakce pouze v případě rychlosti 5 µl/s. Nejméně efektivní se projevilo snížení až na 1 µl/s.

**Tab. 26:** Hodnoty absorbance α-tokoferolu.

| **α-tokoferol, 5 µg/ml** | | | |
|---|---|---|---|
| **Rychlost (µl/s)** | **Absorbance** | | **Průměr hodnot** |
| 10 | 0,1301 | 0,1099 | 0,1200 |
| 5 | 0,1660 | 0,2586 | 0,2123 |
| 1 | 0,0828 | 0,0736 | 0,0783 |

Experiment 4: Časový interval pro adsorpci vzorku na kolonu

Hodnoty absorbance roztoků α-tokoferolu o koncentracích 5 µg/ml a 10 µg/ml s časovým intervalem 60 s neprokázaly zlepšení extrakce v porovnání s měřením bez přidaného času pro adsorpci. Efektivnější se tento krok ukázal pro koncentraci 20 µg/ml.

Vzhledem k tomuto zjištění byla dále proměřována koncentrace 20 µg/ml s různými hodnotami časového intervalu a rovněž byl proměřen roztok připravený v 1 % kyselině mravenčí. V níže uvedené tabulce jsou uvedeny získané hodnoty absorbance.

**Tab. 27:** Průměry hodnot absorbancí α-tokoferolu.

| **α-tokoferol, 20 µg/ml** | | |
|---|---|---|
| **Interval (s)** | **Připraveno v10% methanolu** | **Připraveno v 1% kys. mravenčí** |
| 0 | 0,1995 | 1,1077 |
| 60 | 0,4681 | 1,1290 |
| 120 | 0,4908 | 1,1616 |
| 240 | 0,4056 | 0,8388 |

Jako vyhovující pro dostatečnou adsorpci roztoku α-tokoferolu na koloně byl označen interval 120 s. Byly zaznamenány vyšší hodnoty absorbance a čas potřebný pro extrakci se tímto krokem neprodloužil nikterak významně.

Experiment 5: Optimální objem naneseného vzorku

Získané hodnoty absorbance roztoku butylparabenu extrahovaného na koloně SLE neprokázaly jasnou korelaci se zvyšujícím se množstvím dávkovaného množství vzorku na kolonu v žádné z vyzkoušených možností, tedy výtěžnost byla velmi nízká. Pouze při použití kolony SPE a roztoku butylparabenu o koncentraci 10 µg/ml v rozmezí objemů 100–500 µl v režimu straightflush je možno uvést, že se zvyšujícím se objemem dávkovaného vzorku rostla i absorbance.

Během prvních měření pracovního roztoku cholekalciferolu bylo zjištěno, že roztok na koloně nebyl zachycen a protéká systémem téměř bez retence. Proto byla u koncentrace 1 µg/ml snížena rychlost dávkování vzorku na kolonu na 1 µl/s, ale ani tento krok nevedl k lepší retenci.

Pracovní roztok α-tokoferolu připravený v 10 % methanolu neprokázal zvýšení extrakce v závislosti na zvyšujícím se objemu dávkovaného vzorku. Na druhou stranu dané uspořádání extrakčních parametrů se jevilo jako nejúčinnější z hlediska dosažených hodnot absorbancí (Tab. 27, sloupec 1). Roztok připravený v kyselině mravenčí měřený s časovým intervalem 120 s (sloupec 2) dosahoval velmi podobných hodnot absorbance v celém rozsahu zkoušených objemů. Až při zvýšení naneseného objemu vzorku na kolonu a odebrání časového intervalu (sloupec 3) bylo patrné zvýšení hodnot absorbance, ale pouze při objemech 750 µl a 1000 µl. Z tabulky je také patrné, že objemy 250 µl a 500 µl vykazovaly po odebrání časového intervalu velmi podobné hodnoty absorbancí jako měření před úpravou.

**Tab. 28:** Hodnoty absorbance získané měřením různých objemů roztoků α-tokoferolu.

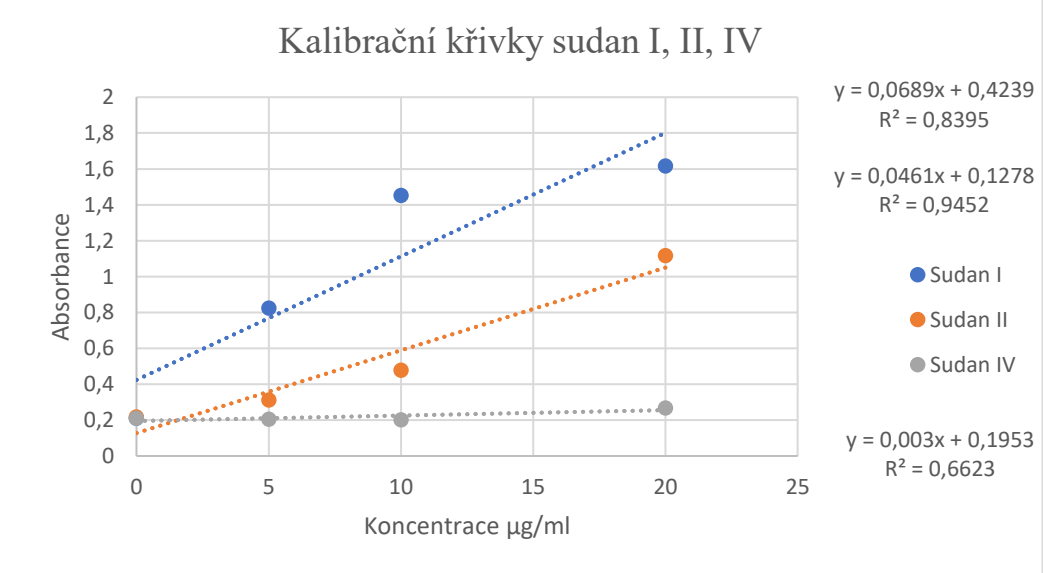
| **α-tokoferol, 20 µg/ml** | | | |
|---|---|---|---|
| **Objem vzorku (µl)** | **V 10 % methanolu** | **V 1 % kys. mravenčí, 120 s** | **V 1 % kys. mravenčí, 0 s** |
| 50 | 0,4669 | 0,1181 | neměřeno |
| 100 | 0,4669 | 0,1674 | Neměřeno |
| 150 | 0,4673 | 0,1345 | Neměřeno |
| 200 | neměřeno | 0,1409 | neměřeno |
| 250 | neměřeno | 0,1407 | 0,1387 |
| 500 | neměřeno | 0,1348 | 0,2901 |
| 750 | neměřeno | neměřeno | 0,4188 |
| 1000 | neměřeno | neměřeno | 0,5790 |

## 5.2 Kalibrační křivky a opakovatelnost

Z naměřených dat uvedených v tabulce č. 29 je patrné, že u sudanu I a IV se předpoklad nenaplnil a k lineární odezvě v závislosti na koncentraci nedošlo. Zatímco hodnoty získané měřením roztoku sudanu II vykázaly relativně lineární odezvu. Hodnoty získané měřením α-tokoferolu rovněž neprokázaly lineární odezvu.

**Tab. 29:** Hodnoty absorbance sudanu I, II a IV, pro sestavení kalibrační křivky.

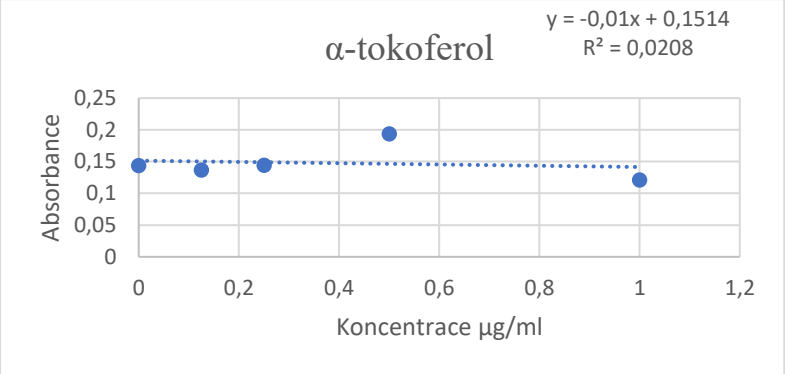
| Koncentrace µg/ml | Sudan I | Sudan II | Sudan IV |
|---|---|---|---|
| 0 | 0,2112 | 0,2177 | 0,2112 |
| 5 | 0,8249 | 0,3122 | 0,2049 |
| 10 | 1,4528 | 0,4781 | 0,2018 |
| 20 | 1,6166 | 1,1166 | 0,2688 |




**Obr. 14:** *Kalibrační křivky Sudanu I, II a IV.*

**Tab. 30:** Hodnoty absorbance α-tokoferolu pro tvorbu kalibrační křivky.

| α-tokoferol | | | |
|---|---|---|---|
| Koncentrace µg/ml | 1. měření | 2. měření | Průměr hodnot |
| 0 | 0,1579 | 0,1287 | 0,1433 |
| 0,125 | 0,1244 | 0,1484 | 0,1364 |
| 0,25 | 0,1463 | 0,1422 | 0,1443 |
| 0,5 | 0,1352 | 0,2520 | 0,1936 |
| 1 | 0,0991 | 0,1423 | 0,1207 |



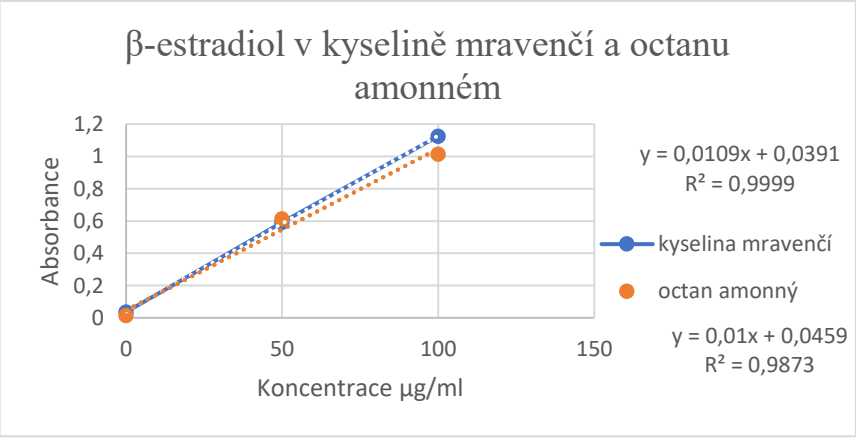

**Obr. 15:** *Kalibrační křivka α-tokoferolu.*

β-estradiol

Kalibrační křivky β-estradiolu v roztoku kyseliny mravenčí a octanu amonného vykázaly poměrně vysokou hodnotu spolehlivosti. Křivka β-estradiolu v hydroxidu amonném není zaznamenána, neboť nedošlo k retenci vzorku na koloně a ani k vlastní extrakci.

**Tab. 31:** Hodnoty absorbance β-estradiolu pro tvorbu kalibrační křivky.

| **β-estradiol** | | |
|---|---|---|
| **Koncentrace µg/ml** | **1 % kyselina mravenčí** | **0,2M octan amonný** |
| 0 | 0,0353 | 0,0131 |
| 50 | 0,5915 | 0,6119 |
| 100 | 1,1252 | 1,0143 |




**Obr. 16:** *Kalibrační křivky β-estradiolu v kyselině mravenčí a octanu amonném.*

Estriol

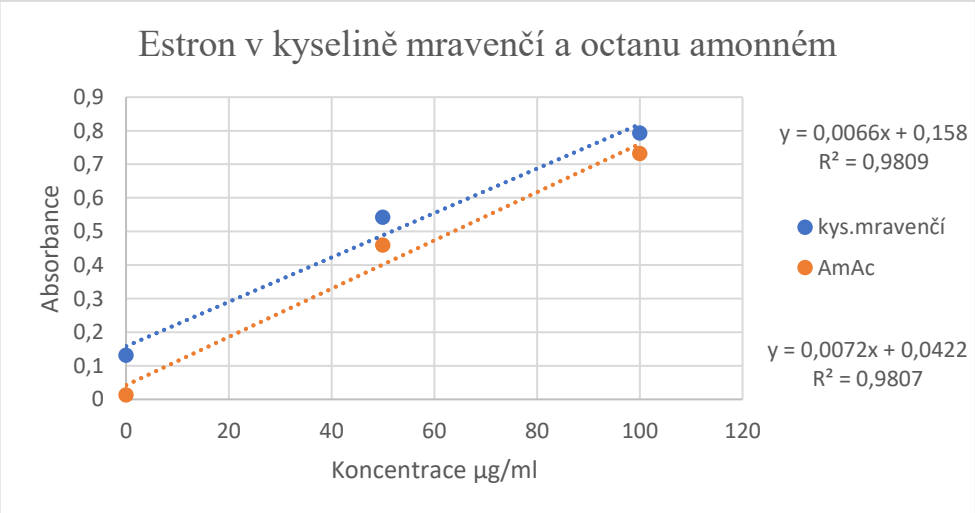
Estriol se nepodařilo extrahovat ani z jednoho pracovního roztoku, neboť vzorek nebyl zadržován na koloně a protékal systémem před působením elučního činidla. Tento výsledek rozporuje původní domněnku o extrakci neionizovaných látek. Rovněž příprava pracovního roztoku estriolu o totožných koncentracích (50 µg/ml a 100 µg/ml) v kyselině chlorovodíkové o hodnotě pH 1 nepřinesla očekávaný efekt.

Estron

Kalibrační křivky estronu připraveného v kyselině mravenčí a octanu amonném prokázaly vcelku vysoký koeficient spolehlivosti, ačkoliv v porovnání s výše uvedenými kalibračními křivkami β-estradiolu se jedná o výsledek horší. Křivka estronu není uvedena, neboť, stejně jako u výše uvedených látek, nedošlo k retenci na koloně.

**Tab. 32:** Hodnoty absorbance estronu pro tvorbu kalibračních křivek.

| **Koncentrace estronu** | **1 % kys. mravenčí** | **0,2M octan amonný** |
|---|---|---|
| 0 µg/ml | 0,1313 | 0,0131 |
| 50 µg/ml | 0,5419 | 0,4597 |
| 100 µg/ml | 0,7927 | 0,7316 |

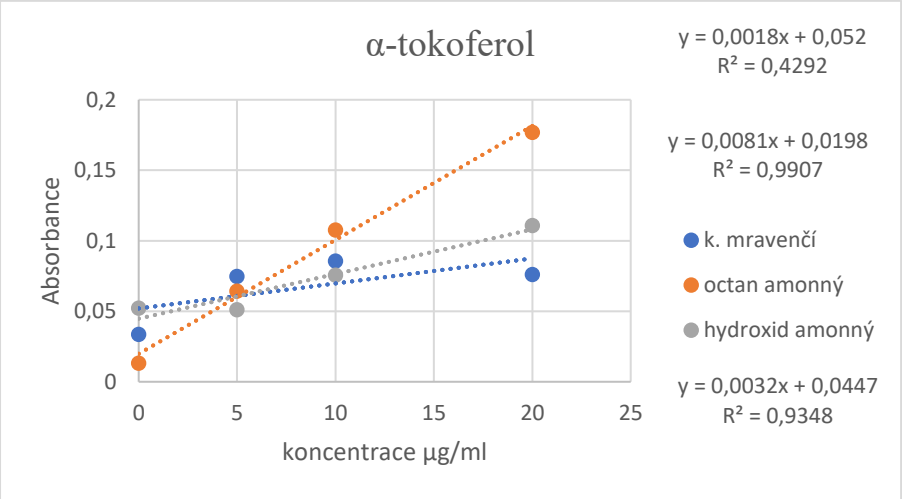



**Obr. 17:** *Kalibrační křivky estronu v kyselině mravenčí a octanu amonném.*

Níže jsou uvedeny kalibrační křivky α-tokoferolu v kyselém, neutrálním a bazickém prostředí. Podle očekávání vykázala nejlepší hodnotu linearity kombinace α-tokoferolu a octanu amonného.

**Tab. 33:** Hodnoty absorbance α-tokoferolu pro vytvoření kalibračních křivek.

| Koncentrace µg/ml | Kyselina mravenčí | Octan amonný | Hydroxid amonný |
|---|---|---|---|
| 20 | 0,0759 | 0,1768 | 0,1108 |
| 10 | 0,0856 | 0,1077 | 0,0755 |
| 5 | 0,0746 | 0,0643 | 0,0511 |
| 0 | 0,0336 | 0,0131 | 0,0522 |

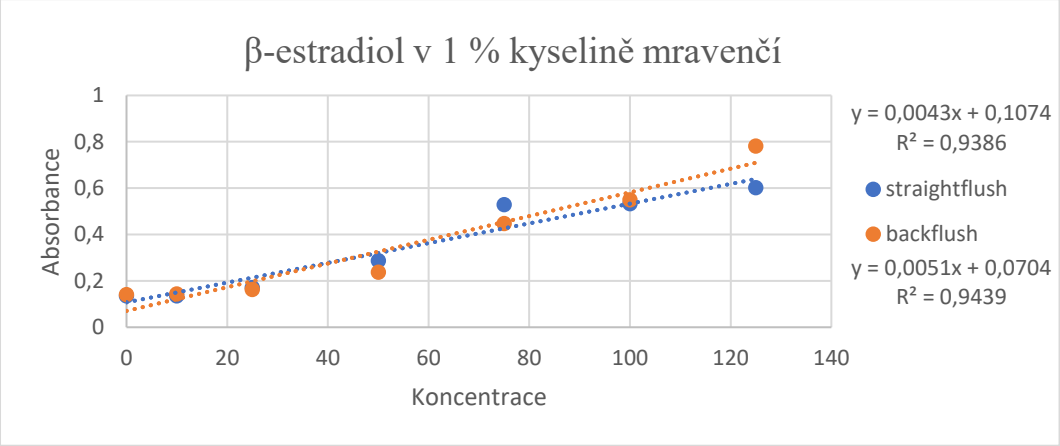



**Obr. 18:** *Kalibrační křivky α-tokoferolu.*

V níže uvedené tabulce jsou uvedeny hodnoty absorbance β-estradiolu získané měřením v obou směrech eluce (straightflush, backflush). Jak je patrné z grafu, rozdíl mezi oběma směry eluce vzorku z kolony byl v tomto případě minimální.

**Tab. 34:** Hodnoty absorbance β-estradiolu v kyselině mravenčí.

| Koncentrace µg/ml | Straightflush | Backflush |
|---|---|---|
| 0 | 0,1347 | 0,1407 |
| 10 | 0,1354 | 0,1434 |
| 25 | 0,1707 | 0,1633 |
| 50 | 0,2865 | 0,2374 |
| 75 | 0,5287 | 0,4465 |
| 100 | 0,5326 | 0,5491 |
| 125 | 0,6020 | 0,7808 |




**Obr. 19:** *Kalibrační křivky β-estradiolu v režimu straightflush a backflush.*

Posledním experimentem při proměřování kalibračních křivek bylo porovnání kalibračních křivek β-estradiolu získaných na koloně SLE a SPE. Jak je vidno z níže uvedené Tab. 34, u kolony SPE došlo u dvou nejvyšších koncentrací k výraznému poklesu absorbance.

**Tab. 35**: Hodnoty absorbance β-estradiolu získané měřením na SLE a SPE koloně.

| **Koncentrace (µg/ml)** | **SLE** | **SPE** |
|---|---|---|
| 0 | 0,1347 | 0,0796 |
| 10 | 0,1355 | 0,2527 |
| 25 | 0,1707 | 0,3914 |
| 50 | 0,2865 | 0,5334 |
| 75 | 0,5288 | 0,5897 |
| 100 | 0,5327 | 0,3331 |
| 125 | 0,602 | 0,1129 |

Opakovatelnost

V následné tabulce zobrazující zjištění opakovatelnosti metody na vzorku butylparabenu extrahovaného na SPE je ve třetím a šestém sloupci uvedena hodnota relativní směrodatné odchylky. Požadavkům na opakovatelnost (RSD ≤ 10 %) vyhovoval v režimu straightflush pouze objem 1000 µl, v režimu backflush vyhovoval pouze slepý vzorek a objem 250µl.

**Tab. 36:** Hodnoty opakovatelnosti metody u vzorku butylparabenu.

| **Butylparaben** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **Objem (µl)** | **Směr** | **RSD** | **Objem (µl)** | **Směr** | **RSD** |
| 0 (blank) | Straightflush | 16,77 % | 0 (blank) | Backflush | 8,54 % |
| 250 | Straightflush | 19,27 % | 250 | Backflush | 7,63 % |
| 500 | Straightflush | 16,24 % | 500 | Backflush | 14,51 % |
| 1000 | Straightflush | 9,69 % | 1000 | Backflush | 30,28 % |

Roztoky β-estradiolu byly v rámci zjištění opakovatelnosti proměřeny podle následující tabulky. V závorkách za počtem měření je uvedena relativní směrodatná odchylka. Od třetího měření byl přidán promývací krok o objemu 25 µl. Rovněž zde byly proměřovány oba směry eluce vzorku z kolony (sloupec 5).

**Tab. 37:** Měření opakovatelnosti roztoku β-estradiolu na koloně SLE.

| **Měření** | **Počet měření (RSD)** | | | **Směr** | **Způsob sběru dat** |
|---|---|---|---|---|---|
| | 10 µg/ml | 50 µg/ml | 125 µg/ml | | |
| 1. | 6x (11,15%) | 6x (23,04%) | 6x (34,17%) | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 2. | - | 9x (13,34%) | - | Straightflush | Jedna série o 9 měřeních |
| 3. | - | 6x (13,20%) | - | Straightflush | Jedna série o 6 měřeních |
| 4. | 6x (3,31%) | 6x (8,16 %) | 6x (21,21 %) | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 5. | 6x (1,45%) | 6x (13,48%) | 6x (33,62 %) | Backflush | 2 série po 3 měřeních |
| 6. | - | 6x (17,38%) | - | Straightflush | Samostatně |
| 7. | - | 6x (7,03 %) | - | Straightflush | 2 série po 3 měřeních |
| 8. | - | 6x (10,11%) | - | Backflush | Samostatně |
| 9. | - | 6x (21,71%) | - | Backflush | 2 série po 3 měřeních |

Následně byly totožné koncentrace roztoků extrahovány na koloně SPE ve směru straightflush, vždy ve dvou sériích po třech měřeních.

**Tab. 38:** Hodnoty opakovatelnosti pro kolonu SPE.

| **Koncentrace** | 10 µg/ml | 50 µg/ml | 125 µg/ml |
|---|---|---|---|
| **RSD** | 3,41 % | 3,12 % | 66,07 % |

Lze konstatovat, že opakovatelnost metody za použití SLE kolony a pro koncentraci 10 µg/ml byla mnohem lepší po přidání promývacího kroku do systému. Naopak koncentrace 125 µg/ml vykazovala příliš vysokou hodnotu relativní směrodatné odchylky, a to jak při použití kolony pro SLE, tak i s použitím SPE a v obou směrech

eluce vzorku. U koncentrace 50 µg/ml se přidání promývacího kroku projevilo pouze v režimu straightflush, kdy byla data sbírána ve dvou sériích, každá o třech měřeních. Při použití režimu backflush nedošlo ke zlepšení opakovatelnosti metody. Ovšem pro tuto koncentraci se jeví výhodnější použití kolony SPE.

# 6. Diskuze celé práce

Podstatou experimentů byly změny extrakčních podmínek, za kterých byla testována on-line SLE extrakce vybraných látek a srovnávána s SPE. Možnosti on-line SLE byly testovány pomocí vybraných analytů (méně polární – parabeny, vitaminy rozpustné v tucích, sudanová barviva a více polární – estrogeny). V následujících řádcích jsou stručně shrnuty a diskutovány poznatky k získaným výsledkům.

Výtěžnost extrakce byla zkoušena na roztocích sudanu a α-tokoferolu. Vzorky se lišily koncentrací a druhem rozpouštědla. Roztoky sudanu I prokázaly nejvyšší míru extrakce na koloně SLE, pokud byly připraveny v 10 % methanolu, zatímco u α-tokoferolu se nejlépe projevil 30 % methanol. Přidané množství NaCl zvyšující iontovou sílu nemělo vliv na SLE extrakci parabenů, ani na sudanu II.

Parametr rychlosti nanesení vzorku na SLE kolonu neměl na extrakci cholekalciferolu vliv – testované nižší hodnoty neprojevily žádné zlepšení extrakce. Zatímco při SLE α-tokoferolu došlo k menšímu zlepšení při rychlosti dávkování 5 µl/s.

Zavedení časového intervalu, kdy byl zastaven tok při dávkování vzorku na kolonu pro podporu adsorpce vzorku na kolonu bylo testováno na α-tokoferolu a jako optimální byl vybrán interval 120 s.

Vhodný rozsah objemů vzorku dávkovaný na kolonu byl testován u butylparabenu, cholekalciferolu a α-tokoferolu. U prvních dvou zmíněných nedošlo ani se zvýšením objemu ke zvýšení absorbance (výtěžnosti), pouze u α-tokoferolu lze říci, že pokud byl připraven v 1 % kyselině mravenčí a byl odebrán časový interval 120 s, pak byla absorbance významně vyšší u roztoků o objemech 750 µl a 1000 µl.

Pro látku β-estradiol extrahovanou na koloně SLE byly vybrány jako vhodné parametry pro sestavení kalibrační křivky následující: příprava roztoku v 1 % kyselině mravenčí, dávkovaný objem vzorku na kolonu 250 µl při rychlosti 10 µl/s se zvoleným časovým intervalem zastavení toku pro adsorpci 120 s. Za těchto podmínek bylo v obou režimech proměřeno šest koncentrací a slepý vzorek.

Opakovatelnost metody zjišťovaná u látek (butylparaben a β-estradiol) při použití kolony SLE značně kolísala.

Obecně lze říci, že experimenty prováděné na koloně SLE vyžadovaly pečlivější vyvážení extrakčních parametrů, a ne vždy byla nalezena jejich vhodná kombinace. Zatímco extrakci více lipofilních látek (sudany) příliš neovlivňovala kyselost či bazicita prostředí, u polárnějších látek se tento parametr jevil jako klíčový. Při použití kolony SPE ve většině experimentů nastavené podmínky vedly k uspokojivým výsledkům. Také opakovatelnost metody byla při použití kolony SPE vyšší.

# 7. Závěr

V této práci byly na různých látkách testovány a optimalizovány parametry s cílem dosáhnout co nejefektivnější extrakce metodou SLE začleněné do SIA. Testován byl vhodný objem nadávkovaného vzorku, rychlost dávkování vzorku na kolonu, výše objemu, příprava vzorků v různě ředěném rozpouštědle a optimální časový interval pro adsorpci vzorku na kolonu.

V průběhu měření se nepodařilo dosáhnout vhodných podmínek pro SLE extrakci pro všechny uvedené látky. Nebyly úspěšné pokusy zvýšení účinnosti extrakce pomocí přídavku NaCl, který podporuje iontovou sílu roztoku a zvyšuje tím afinitu analytu k sorbentu. Naopak jistou odezvu přinesly obměny dalších parametrů, avšak nebyly dostatečně prostudovány jejich vzájemné kombinace. Pouze látky β-estradiol bylo dosaženo optimální kombinace podmínek vhodných pro SLE extrakci.

# 8. Bibliografie


1. **Paseková, Hana, Polášek, Miroslav a Solich, Petr.** Sekvenční injekční analýza. *Chemické listy.* 1999, stránky 354 - 359.

2. **Růžička, Jaromír.** Flow Injection Analysis. [Online] [Citace: 15. Duben 2018.] http://www.flowinjectiontutorial.com/index.html.

3. **Luque de Castro, M.D., Ruiz-Jiménez, J. a Pérez-Serradilla, J.A.** Lab-on-valve: a useful tool in biochemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry.* 2008, Sv. 27, 2.

4. **Pike, Erica.** A Time Saving Approach to Sample Preparation . [Online] 12. Srpen 2015. [Citace: 16. Duben 2018.] http://www.foodqualityandsafety.com/article/a-timesaving-approach-to-sample-prep/.

5. ***Organic Chemistry Lab.*** **[Online] [Citace: 26. Duben 2018.] https://www.thevespiary.org/rhodium/Rhodium/chemistry/extraction_theory.html.**

**6. Majors, Ronald. Supported Liquid Extraction: The best-Kept Secret in Sample Preparation. *LCGC Europe.* 12. Srpen 2012, Sv. 25, 8, stránky 430-435.**

**7. *Biotage.* [Online] [Citace: 26. Duben 2018.] http://www.biotage.com/product-page/isolute-sle-supported-liquid-extraction-products.**

**8. Pike, Erica. A Simplifying Liquid Extractions. *The Column.* 2015, Sv. 11, 3.**

**9. Borkovcová, Ivana. Úvod do problematiky extrakčních metod. [Online] [Citace: 30. Duben 2018.] https://cit.vfu.cz/ivbp/wp-content/uploads/2012/01/KA-2340_4_8up_extrakce1.pdf.**

**10. PubChem. [Online] [Citace: 30. Duben 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov.**

**11. Lewis, K.M. a Archer, R.D. pKa values of estrone, 17β-estradiol and 2-methoxyestrone. *Steroids.* Listopad 1979, Sv. 34, 5, stránky 485-499.**

**12. Kratochvíl, František. *Epitesty.* [Online] [Citace: 30. Duben 2018.] http://www.epitesty.cz/pasports/B%20020.pdf.**

**13. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.10296256.html?rid=7b1b5e65-fc49-4803-a9f5-cb46a8c69a93 .**

**14. Sigma-Aldrich. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/103624?lang=en&region=CZ.**

**15. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.13621577.html?rid=206a11b6-70ed-428d-be41-266cfe621ff3 .**

**16. Sigma-Aldrich. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/199656?lang=en&region=CZ.**

**17. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.11252033.html .**

**18. Sigma-Aldrich . [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/198102?lang=en&region=CZ.**

**19. FooDB. [Online] 23. Leden 2018. [Citace: 30. Duben 2018.] http://foodb.ca/compounds/FDB012732.**

**20. Douša, Michal. News form HPLC. [Online] [Citace: 29. Duben 2018.] http://hplc1.sweb.cz/.**

**21. Huq, Shahana a Brusius, Matthew. *Phenomenex.* [Online] [Citace: 25. Duben 2018.] http://www.phenomenex.com/Application/Detail/22848?returnURL=/Application/Search.**

**22. PubChem. [Online] [Citace: 30. Duben 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7456.**

**23. PubChem. [Online] [Citace: 1. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5756.**

**24. PubChem. [Online] [Citace: 1. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5870.**

**25. PubChem. [Online] [Citace: 1. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7184.**

**26. PubChem. [Online] [Citace: 2. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5757.**

**27. PubChem. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5280795.**

**28. PubChem. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14985.**

**29. PubChem. [Online] [Citace: 3. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5858445.**

**30. PubChem. [Online] [Citace: 2. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5809936.**

**31. PubChem. [Online] [Citace: 2. Květen 2018.] https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5876571.**

# 9. Příloha

**Tab. 39:** Optimalizovaný program používaný pro SLE extrakci.

| **Měření vzorku** | |
|---|---|
| Přepnutí ventilu do vzorku | port 7 |
| Nasátí pumpou – promývací krok | objem (25 µL), průtoková rychlost (10 µL/s) |
| Přepnutí ventilu do odpadu | port 1 |
| Vypuštění objemu do odpadu | objem (50 µL), průtoková rychlost (20 µL/s) |
| Přepnutí ventilu do vzorku | port 7 |
| Nabrání objemu vzorku | objem (250 µL), průtoková rychlost (10 µL/s) |
| Přepnutí ventilu na kolonu | port 10 |
| USB4000UV start acquire | request period (0,1 s) |
| USB4000UV získání spektra | N/A |
| Nanesení objemu vzorku na kolonu | objem (µL), průtoková rychlost (10 µL/s) |
| Časový interval | čas (120 s) |
| Pump 2 dispense | objem (400 µL), průtoková rychlost (10 µL/s) |
| Časový interval pro vyrovnání tlaků | čas (4 s) |
| Přepnutí ventilu do elučního činidla | port 2 |
| Nasátí objemu pumpou | objem (600 µL), průtoková rychlost (20 µL/s) |
| Přepnutí ventilu na kolonu | port 10 |
| Nanesení objemu elučního činidla | objem (1000 µL), průtoková rychlost (10 µL/s) |
| USB4000UV stop acquire | N/A |