

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Nové trendy v analýze biologického materiálu

Kateřina Šafranková

Bakalářská práce

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2015/2016

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Kateřina Šafranková**  
Osobní číslo: **C13575**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Název tématu: **Nové trendy v analýze biologického materiálu**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Studium současné literatury na dané téma včetně internetových stránek s nejnovějšími poznatky v daném oboru.
2. Vypracování rešerše na dané téma v souladu s obecně ustanovenými zásadami Univerzity Pardubice.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Michal Šiller, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2015**

Termín odevzdání bakalářské práce: **3. července 2016**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 15. února 2016

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna od mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezentačním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákonů o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 3. 7. 2017

.....

Poděkování patří vedoucímu bakalářské práce Mgr. Michalovi Šillerovi, PhD. za poskytnutí odborných rad a informací. Děkuji za trpělivost a čas, který mi během přípravy bakalářské práce věnoval.

## **ANOTACE**

Tato bakalářská práce je věnována používaným metodám a novým technologiím pro přípravu a analýzu vzorků. Mezi moderní metody patří například QuEChERS nebo mikroextrakce. Metody jsou rychlé a využívají se v medicíně, farmacii nebo v zemědělství.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

analýza, vzorek, extrakce, chromatografie, RapidFire

## **TITLE**

This bachelor thesis deals with methods which are used and new technologies for preparation and analysis of the samples. Among methods belong for example QuEChERS. Technologies are quick and they are used in medicine, pharmacy or agriculture.

## **KEYWORDS**

analysis, sample, extraction, chromatography

# OBSAH

0	ÚVOD.....	12
1	Chromatografie.....	13
2	Hmotnostní spektrometrie .....	16
2.1	Princip.....	16
2.2	MALDI .....	17
2.3	Hmotnostní spektrometrie biomolekul a biologických markerů .....	19
2.4	Spojení metod s hmotnostní spektrometrií .....	19
2.4.1	Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií .....	19
2.4.2	Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií 20	
2.4.3	Využití HPLC/MS.....	21
3	Extrakce na pevné fázi.....	22
3.1	RapidFire .....	24
3.1.1	Spojení RapidFire s hmotnostní spektrometrií.....	24
3.1.2	RapidFire typy.....	25
3.1.3	Výhody RapidFire .....	26
3.2	Oasis HLB Prime Sorbenty pro SPE .....	27
3.2.1	Online SPE pomocí Oasis .....	27
3.3	THC .....	27
3.4	Miniaturizace SPE .....	28
3.5	Modifikace SPE .....	28
3.5.1	SBSE .....	28
3.6	QuEChERS .....	29
4	Mikroextrakce.....	32
4.1	Mikroextrakce na pevné fázi.....	32

4.1.1	Využití.....	33
4.1.2	Faktory ovlivňující SPME.....	34
4.1.3	SPME vlákna.....	34
4.1.4	Sol-gel .....	35
4.1.5	Automatizace SPME .....	36
4.2	Mikroextrakce kapalnou fází .....	37
4.2.1	Princip techniky .....	37
4.2.2	Modifikace DLLME.....	38
4.2.3	HF-LPME.....	39
5	Extrakce na kapalně fázi.....	40
6	HPLC sorbenty .....	42
7	Monolitické kolony .....	43
7.1	Druhy .....	44
7.1.1	Monolit oktadecyl .....	44
7.1.2	Příprava polymerní monolitické kolony.....	45
7.1.3	Tubulární kolony .....	45
7.1.4	Silikagelové monolity .....	46
8	Aplikace metod.....	47
8.1	Laserová desorpce.....	47
8.2	Lab-on-chip.....	47
9	Diagnostika- biomarkery .....	49
10	ZÁVĚR .....	52
11	POUŽITÁ LITERATURA .....	53
12	POUŽITÉ ILUSTRACE.....	59



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Plynový chromatograf .....	13
Obrázek 2 Kapalinový chromatograf.....	14
Obrázek 3 Schéma hmotnostního spektrometru .....	16
Obrázek 5 Schéma MALDI- TOF .....	18
Obrázek 4 Princip MALDI .....	18
Obrázek 6 Spojení HPLC/MS.....	21
Obrázek 7 Průběh SPE.....	22
Obrázek 8 Systém RapidFire/MS .....	26
Obrázek 9 THC .....	28
Obrázek 10 Dvoufázové zařízení SBSE .....	29
Obrázek 11 Přidání acetonitrilu .....	31
Obrázek 12 Centrifugace .....	31
Obrázek 13 Vialky pro GC nebo HPLC analýzu.....	31
Obrázek 14 Schéma SPME chráněné membránou, používáno Pawliszyn a Musteata.	33
Obrázek 15 Schématické znázornění HS- SPME .....	33
Obrázek 16 SPME stříkačky- složení .....	34
Obrázek 18 SPME vlákna .....	35
Obrázek 17 SPME vlákna .....	35
Obrázek 19 Přejít sol-gel .....	36
Obrázek 20 Princip DLLME.....	38
Obrázek 21 Schéma uspořádání HF-LPME.....	39
Obrázek 22 Provedení LLE v dělicí nálevce .....	41
Obrázek 23 HPLC sorbenty .....	42
Obrázek 24 Příprava polymerních monolytických kolon .....	45
Obrázek 25 Lab- on- chip .....	48
Tabulka 1 Sorbenty k přípravě vzorku.....	23

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

APPI	Ionizace UV zářením
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku
BSAI	Index povrchu biologického materiálu
CEC	Kapilární elektrochromatografie
CNTs	Uhlíkové nanotrubičky
CZE	Kapilární zónová elektroforéza
DART	Ionizace metastabilním plynem
DESI	Ionizace desorpčním elektrosprejem
DLLME	Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina
ELISA	Enzymová imunoabsorpční metoda Enzyme- Linked Immuno Sorbent Assay
ESI	Ionizace elektrosprejem (za vysokého napětí)
GC	Plynová chromatografie
GC x GC	Dvojrozměrná plynová chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GC/MS/MS	Plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
HF-HPME	Mikroextrakce na kapalně fázi s dutými vlákny
HM	Vysokomodulové vlákno
Hm %	Hmotnostní procenta
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC/MS	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC/MS/MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
IEMA	Enzymoimunologická analýza, Immuno Enzyme Metric Assay
KVV	Kondenzát vydechovaného vzduchu
LC	Kapalinová chromatografie
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
LPME	Extrakce na kapalně fázi
MALDI	Ionizace laserem za přítomnosti matrice
MALDI-TOF	Ionizace laserem za přítomnosti matrice s detektorem doby letu

MEPS	Miniaturizace extrakce na pevné fázi
MS	Hmotnostní spektrometrie
m/z	Hmotnost iontu/ náboj iontu
ODM	Monolit oktadecyl
PSA	Prostatický specifický antigen
QuEChERS	QuEChERS
RP-HPLC	Reverzní vysokoúčinná kapalinová chromatografie
SBE	Stir-bar sorpční extrakce
SDME	Mikroextrakce s jednou kapkou
SPE	Extrakce na pevné fázi
SPME	Mikroextrakce na pevné fázi
SPME/GC-MS	Extrakce na pevné fázi s plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
THC	Tetrahydrokannabinolu
TOF	Detektor doby letu
V <sub>M</sub>	Mrtvý objem

## 0 ÚVOD

Před samotnou analýzou je nutné provést přípravu vzorku pomocí vhodné instrumentální metody, která představuje nedílnou součást zacházení se vzorkem po vstupu do analytické laboratoře. Zpracování vzorků z různých materiálů s postupem času se neustále vyvíjelo a také dnes se zdokonaluje. V dnešní době trend přípravy vzorku směřuje k rychlému zpracování vstupního materiálu s co nejvyšším možným výtěžkem stanoveného analytu.

Cílem této práce je shrnout moderní přístupy pro přípravu vzorků jednak v oblasti zpracování biologického materiálu, ale i v oblasti chemie. Další z cílů bakalářské práce je porozumět odborné literatuře a jejímu zpracování ve formě rešerše tak, aby byla užitečná pro sdělení informací širší odborné veřejnosti.

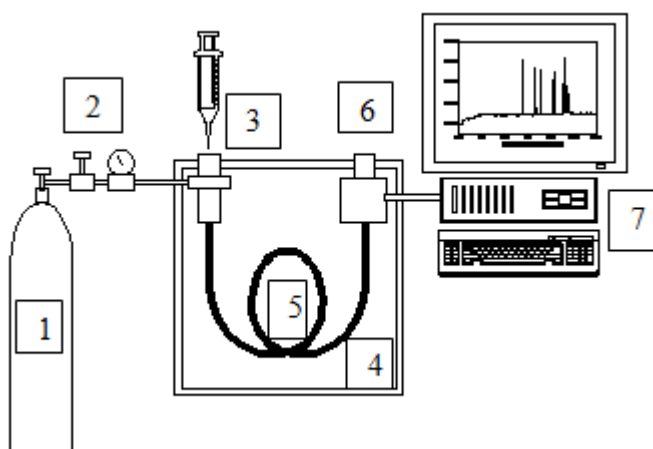
Příprava vzorku je nedílnou součástí laboratorních aktivit od příjmu až po získání výsledků. V této práci se krátce zmíním i o současných nejvyužívanějších analytických metodách.

# 1 Chromatografie

Chromatografie je separační technika, která je založená na rozdělení směsi vzorku mezi dvě fáze, nepohyblivou (stacionární fází) a pohyblivou (mobilní fází). Tyto fáze se od sebe odlišují fyzikálně-chemickými vlastnostmi. Podle uspořádání stacionární fáze rozlišujeme chromatografii kapilární, kolonovou nebo-li sloupcovou. Dalším kritériem dělení je skupenství mobilní fáze, příkladem je plynová chromatografie a kapalinová chromatografie. (Churáček, 1993, s. 151-152), (Jordánová, 2013, s. 2-3)

## 1.1 Plynová chromatografie

GC je typ chromatografie, která je charakteristická tím, že mobilní fází je plyn a analyzovaný vzorek je dělen v plynném stavu. Vzhledem ke komplikovanosti vzorku se dnes běžně používá kompletní dvourozměrná plynová chromatografie.



**Obrázek 1** Plynový chromatograf

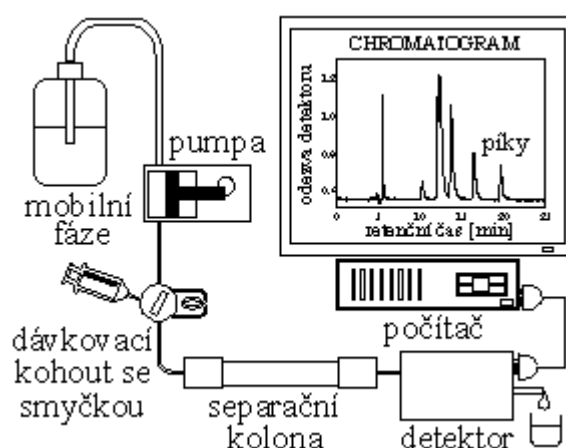
- 1- tlaková lahev s nosným plynom, 2- regulace a měření průtoku,  
3- nástřiková hlava, 4- termostat, 5- kolony, 6- detektor, 7- počítač

### 1.1.1 Dvourozměrná plynová chromatografie

GC x GC využívá dvě kolony, které mají různou selektivitu vůči analytům ve vzorku a jsou zapojeny v sérii pomocí modulátoru. (Wojtowicz a kol., 2013, s. 4-5) *V porovnání s jednorozměrnou GC přináší tato technika zvýšení separační účinnosti, díky kryofokusaci zlepšení chromatografického rozlišení a snížení limitu detekce.* (Wojtowicz a kol., 2013, s. 5)

## 1.2 Kapalinová chromatografie

Existuje několik typů metod kapalinové chromatografie. Mezi nejjednodušší kapalinové chromatografie patří obyčejná chromatografie za atmosférického tlaku, která však nezajišťovala dostatečnou separaci látek. Dnes se již běžně využívá vysokoúčinná kapalinová chromatografie.



Obrázek 2 Kapalinový chromatograf

### 1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Jedná se o chromatografickou metodu, která patří mezi nejlepší a neúčinnější preparativní techniky. HPLC slouží především pro analýzu tepelně nestálých a málo těkavých látek. (Holčapek, 1998, s. 278) Je to metoda, při které se využívá vysokého tlaku, který zvyšuje účinnost rozdělení látek. Používají se kolony, které jsou dodávány s náplní přímo

danou odbornou firmou. Mezi analytické kolony patří kolony s jemně zrněnými náplněmi. V průběhu chromatografického procesu jsou sledovány dvě veličiny - eluční čas a eluční objem. Eluční čas sleduje časový průběh operace. (Jordánová, 2013, s. 4-17) Eluční objem je objem mobilní fáze, která proteče od doby, kdy je vzorek nastříknut do HPLC systému do doby, než bude nejvyšší koncentrace separované látky v eluátu. Další důležitou veličinou je mrtvý objem (VM) skládající se z mrtvého objemu systému (potrubí, kapiláry) a mrtvého objemu kolony. (Jordánová, 2013, s. 15-17) Je-li na kolonu nanesena inertní látka, její eluční objem je roven elučnímu mrtvému objemu. (Jordánová, 2013, s. 16)

HPLC se běžně *se používá pro analýzu klinických, veterinárních a potravinářských vzorků*. (Brandšteterová a kol., 2000, s. 13-14) HPLC umožňuje separovat parentní látky a také produkty jejich rozkladu nebo metabolity analyzovaných biologicky aktivních látek v závislosti na selektivitě používaného detektoru. Často je nutné stanovit velmi nízké koncentrace analytu za přítomnosti interferujících látek. (Brandšteterová a kol., 2000, s. 13 - 14) *Proto musí být úprava biologických vzorků před separací účinná*. (Brandšteterová a kol., 2000, s. 13-14) Vhodně zvolenou metodou lze provést separaci při analýze léčiv i s běžným vybavením za 1-5 minut. (Macek a kol., 2000, s. 79) Pro velmi rychlé analýzy při velmi nízké koncentraci léčiv je výhodné zvolit spojení HPLC/ MS z důvodu vyšší citlivosti daného typu detektoru. (Holčapek a kol., 1998, s. 281-283)

### 1.2.2 Uspořádání HPLC

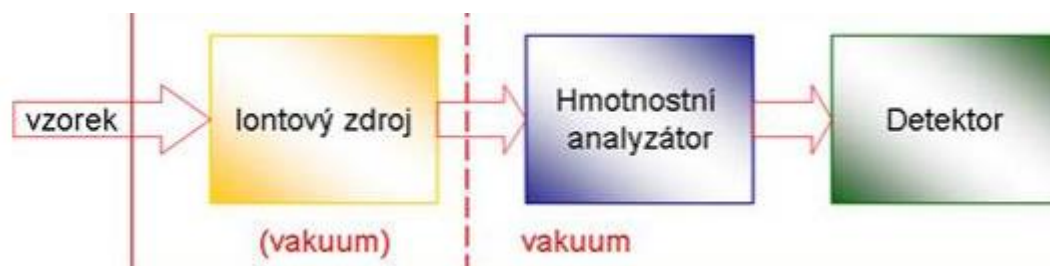
Off-line dvourozměrné uspořádání HPLC, které se dříve více využívalo. Jedná se o poměrně snadné, ale zdlouhavé a obtížné na automatizaci. Při této chromatografii může docházet k záměně, ale i k ztrátě vzorku. V tomto uspořádání se izoluje část vzorku, která byla separována v jednom systému a další separace proběhla v jiném systému (druhé chromatografické koloně).

On-line zapojení je technika oproti off-line zapojení rychlejší, vhodnější z hlediska opakovatelnosti. Její nevýhodou je, že je celkem obtížná na obsluhu a potřebuje specifické propojení. (Godula, 2005, s. 934- 936) *Vybraná frakce eluátu je převáděna z jedné kolony pomocí šesticestného přepínacího ventilu do další kolony*. (Jandera, 2010, s. 441-442)

Obě tyto techniky umožňují zjistit informace jen o vybrané části vzorku. (Jandera, 2010, s. 441)

## 2 Hmotnostní spektrometrie

MS je fyzikálně- chemická metoda sloužící jako detekční koncovka pro GC a HPLC chromatografii, ale také například pro kapilární elektroforézu. (Friedecký a kol., 2012, s. 152-153) Tato metoda je citlivá, specifická, rychlá a poskytuje jednoduchou interpretaci dat. *Určuje hmotnosti atomů, molekul a molekulových fragmentů po jejich převedení na ionty.* (Hernychová, 2008, s. 3) Využívá se také k identifikaci proteinů, odhaluje mutace a DNA sekvenční chyby, dále umožňuje analýzu nekovalentních komplexů. Přístroj, který je používán se nazývá hmotnostní spektrometr. Obecně se skládá se z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru a počítače. (Hernychová, 2008, s. 1-61). Získaným výsledkem je hmotnostní spektrum, které graficky vyjadřuje závislost četnosti iontů na hodnotě hmotnosti iontu/náboj iontu ( $m/z$ ). Tento záznam je charakteristický pro danou látku. (Havlíček, 2001, s. 121-123)



Obrázek 3 Schéma hmotnostního spektrometru

### 2.1 Princip

MS je v podstatě založena na podobném principu jako elektromigrační nebo chromatografické separace. Hlavní rozdíl mezi metodami spočívá v prostředí, kde dochází k separaci látek. Typické prostředí pro chromatografie je kapalina nebo plyn, v nich dochází k separaci analytů, která je založena na interakci se stacionární fází. Mezi elektromigrační metody patří elektroforéza, která využívá rozdílné rychlosti nabitých částic v elektrolytu v přítomnosti stejnosměrného elektrického pole. MS je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. (Friedecký a kol., 2012, s. 152)

Existuje mnoho ionizačních technik. K ionizaci dochází za pomoci vysokého napětí, elektrosprejem (ESI), UV záření (APPI), chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). (Lemr, 2001, s. 100-105) Desorpce analytů z pevných povrchů je možné provádět za pomoci

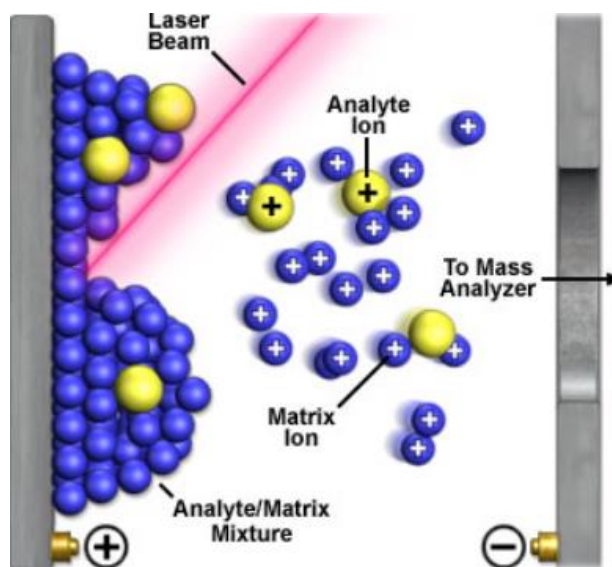


laserů (MALDI), metastabilního plynu (DART) nebo desorpčního elektrospreje (DESI). (Wojtovicz a kol., 2013, s. 3- 11), (Friedecký a kol., 2012, s. 152- 154)

Pro analýzu biologických vzorků, proteinů a jiných biomolekul, se v současné době používá kombinace elektrospreje a MALDI. ESI (ionizace elektrosprejem) umožňuje ionizaci středně polárních molekul až po ionty. (Holčapek, 1998, s. 4)

## 2.2 MALDI

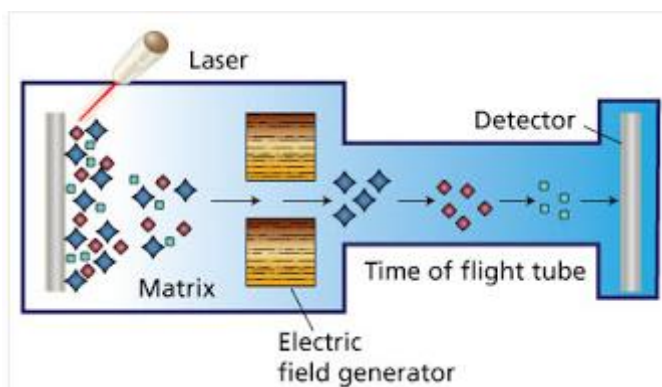
MALDI je metoda, která využívá ionizaci laserem. Patří mezi měkké ionizační techniky. (Hernychová, 2008, s. 15-17), (Holčapek, 1998, s. 278) *Zkoumaná látka je v pevné matici zkrystalizovaná* (Hernychová, 2008, s. 15) a ozářená laserovým pulsem, ale je možné využít i jiné pulsní techniky, jedna z možností je UV záření. Kdyby se ionizace laserem prováděla přímo, mohlo by docházet k nežádoucímu štěpení, proto se používá látka, umožňující přenos ionizační energie na vzorek a tím zabrání nežádoucímu štěpení. (Hernychová, 2008, s. 9-17) Krátkým laserovým ozářením (několik nanosekund) dochází k ionizaci molekul matrice, tedy dojde ke vzniku částic jak neutrálních, tak kladně i záporně nabitých iontů. Proud těchto iontů je usměrněn do analyzátoru a následně detektorem a počítačem vyhodnocen. Tento postup se používá hlavně ke stanovení látek nižších molekulových hmotností. (Hernychová, 2008, s. 15), (Ubik, 2001, s. 6-26)



Obrázek 4 Princip MALDI

Metoda MALDI-TOF se využívá ke stanovení vyšší molekulových hmotností. K stanovení se používá laserová ionizace za přítomnosti matrice s detektorem doby letu (TOF). (Havlíček, 2001, s. 121-123) *Před ionizací je vzorek smíchan s organickou kyselinou (matrice), ve které proběhne snadná absorpce energie laseru a následně se vysuší.* (Friedecký a kol., 2012, s. 154) Rychlost iontů se urychlí působením elektrického pole a přes mřížku vstupují do vakua v trubici detektoru. Pomocí detektoru je možné změřit dobu průletu, a poté vypočítat rychlost částic.

Metoda MALDI byla vyvinuta původně pro kvalitativní analýzu peptidů a bílkovin. Dnes se využívá pro analýzu nukleových kyselin, nízkomolekulárních anorganických a organických látek. Výhodou je rychlost a vysoká citlivost. Vzorek se při analýze nerozpadá, což umožňuje měřit složitější směsi. Metodu můžeme kombinovat jako detekční koncovku se separačními metodami (gelová elektroforéza, kapalinová chromatografie). (Hernychová, 2008, s. 1-61)



Obrázek 5 Schéma MALDI- TOF

## 2.3 Hmotnostní spektrometrie biomolekul a biologických markerů

Hmotnostní zobrazení je pro identifikaci biomarkerů, příkladem můžou být molekuly, které charakterizují patologický stav. Pokud to dovolí dynamický rozsah, můžeme hodnotit mimo jiné nádorovou tkáň, případně subtypy tumorů na základě souboru bílkovin nebo jiných specifických molekul, které jsou ve zdravých tkáních zastoupeny jinak. Při hledání molekulárních znaků nějakého infekčního onemocnění, nebo lze přímo porovnávat tkáň zdravou a infikovanou. Dále můžeme sledovat, do jakých orgánů se ukládá podané nízkomolekulární léčivo a jak dochází k jeho metabolismu. Případně můžeme sledovat molekulární odezvu na léčebný proces. (Friedecký a kol., 2012, s. 152-157)

## 2.4 Spojení metod s hmotnostní spektrometrií

Výhodou spojení metod GC/MS nebo HPLC/MS oproti klasické chromatografii je hlavně vysoká selektivita. Selektivitu lze zvýšit vhodně vybranými ionty, výběrem selektivnější ionizační techniky.

*Pro výrazné zvýšení selektivity jsou k dispozici tandemová GC/MS/MS a HPLC/MS/MS uspořádání.* (Holčapek a kol., 1998, s. 114-115) Při analýzách analytů ve složitých biologických maticích (krevní plazma, sérum, tkáň, moč) nelze bez těchto metod obejít nebo při farmaceutických analýzách. Tyto metody jsou rychlejší, díky nižším požadavkům na dělení. (Holčapek a kol., 1998, s. 113-116)

### 2.4.1 Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

V GC/MS je ve vyhřívaném nástřikovém prostoru vzorek zplyněn a zaveden na počátek GC kolony, separovány na jednotlivé komponenty a vstupují do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, dále jsou identifikovány a kvantifikovány. Informace získáváme vyhodnocením chromatogramu (píků). Pomocí vakuových vývěv je možné udržet v MS analyzátoru potřebné vakuum.

Spojení výstupu z kolony a vstupu hmotnostního detektoru mezi GC a MS má interface různé konstrukce dle typu kolon.

Přímé spojení je pro kolony s malým průměrem do 0,2 mm, ty jsou propojeny krátkou kapilárou. Modifikací přímého spojení je zapojení s otevřeným děličem toku, kdy dochází k vyrovnání tlaku mezi kolonou a detektorem.

Využívá se k identifikaci, zjištění struktur, molekulové hmotnosti. Jedná se o běžnou metodu, avšak cenově nákladnější. (Holčapek a kol., s. 4-6), (Friedecký a kol., 2012, s. 152-157), (Wojtovicz a kol., 2013, s. 3-4)

#### 2.4.2 Spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

HPLC/MS je spojení, kdy se kapalná mobilní fáze, obsahující analyt, zavádí do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Dochází zde k desolvataci molekul analytu, jeho ionizaci a zavedení do analyzátoru. (Holčapek a kol., 2012, s. 152-157)

Mezi MS analyzátory patří například kvadrupólové analyzátory, které jsou schopné pracovat při vyšších tlacích a jsou běžné pro využití v kvantitativní analýze. (Navrátil a kol., 2001, s. 117-120)

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu složitých směsí je nejučinnější využití kombinaci metod HPLC/MS. Spojení HPLC/MS je složitější než u GC/MS, protože je nutné odstranit poměrně velký přebytek mobilní fáze. Spojení je možné realizovat off-line nebo on-line. Off-line spojení je starší metoda. Z kolony se eluát jímá do frakcí, následně jsou spektrálními metodami analyzovány.

Přímý vstup eluátu lze použít pouze pro mikrokolony a kapiláry s průtokem maximálně 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ , jinak je nutné použít například diaframu s malým otvorem 5 – 15  $\mu\text{m}$  jako dělič toku. Dalším spojením, které je možné využít, tak je s transportním převodníkem. Na vyhřívaný drátek je neustále nanášen eluát z kolony, poté co je rozpouštědlo odpařené, následuje transport látek do iontového zdroje, kde po zahřátí na 200-300  $^{\circ}\text{C}$  je látka odpařena a ionizována. Tedy je založená na principu nekonečného drátu. Drátek je možné nahradit nekonečným páskem, kterým získáme při převodu vzorku vyšší výtěžek. (Malárová, 2009, s. 40-49)

Vzorek je ve formě roztoku přiváděn na začátek HPLC kolony nebo přímo do MS systému. Při přímém vstupu je možné snadno regulovat koncentraci analytu, jinak by došlo k přehlcení analyzátoru. Desolvace a ionizace je provedena v jediném prostoru. Ionizaci je možno realizovat elektrosprejem (ESI) nebo atmosférickou chemickou ionizací (APCI). (Holčapek a kol., 1998, s. 278- 286), (Lemr a kol., 2000, s. 27). Získaná data daného analytu z hmotnostní spektrometrie poskytuje více specifických informací. (Lehotay, 2000, s. 9-10)



**Obrázek 6** Spojení HPLC/MS

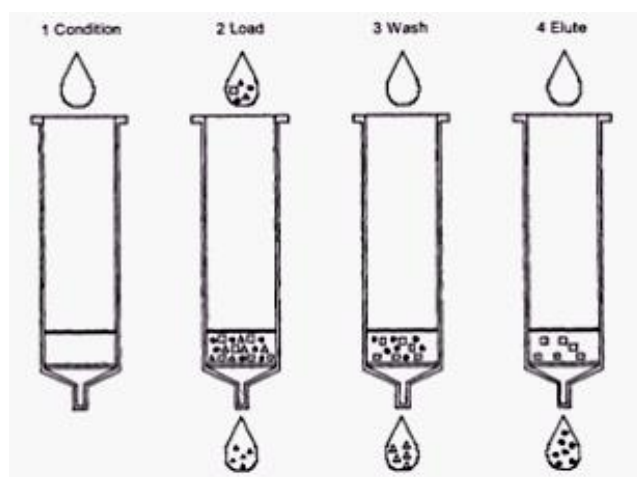
### 2.4.3 Využití HPLC/MS

Spojení HPLC/ MS s ionizací za atmosférického tlaku umožňuje v systémech, jak s normálními, tak s obrácenými fázemi bez omezení průtoku a nezávisí na složení mobilní fáze. Není vhodné používat netěkavé anorganické sloučeniny pro tvorbu pufrů, protože dochází usazování sloučenin v hmotnostním spektrometru a významné ovlivnění výsledků analýz. (Holčapek a kol, 1998, s. 278-283)

S HPLC/MS je spojována miniaturizace, kdy docházelo k změnám kolon. Dnes se běžně používají otevřené kolony, které umožňují nanášet minimální množství vzorku, což je výhodné pro stopovou analýzu. Nevýhodou těchto kolon je snižování relativní kapacity náplně a pokles dynamického rozsahu. (Churáček, 1993, 156-285), (Holčapek a kol., 1998, s. 281-283).

### 3 Extrakce na pevné fázi

Metoda SPE se využívá pro separaci a čištění. Pro biologické analýzy vzorku především biologického původu je důležitá předúprava vzorků a jejich čištění. Obvykle se používají silné kyseliny nebo organická rozpouštědla, ale jejich účinkem může dojít k degradaci cílového analytu například proteinu či nízkomolekulární látky (léčiva). (Plíšek, 2015, s. 56-57), (Vijayaraj et al., 2013, s. 2-4) SPE je široce rozšířena díky jednoduchému použití, má menší spotřebu nevodných rozpouštědel a velmi dobrou dostupnost sorbentů různých druhů v porovnání s jinými metodami. Nejvíce rozšířeným sorbentem SPE je C18. Díky tomu je tato metoda nenáročná a je možná jednoduchá automatizace a lze ji aplikovat na úpravu biologických vzorků (plazma, moč) obsahující širokou škálu analytů (zejména aplikace pro široké spektrum léčiv). (Goliáš, 2013, extrakční techniky), (Vijayaraj et al., 2013, s. 2-4) Lze ji také online spojit se separační metodou či přímo s detektorem (přímé spojení SPE s hmotnostním spektrometrií). Používané sorbenty mají také jisté nevýhody. Běžné sorbenty jsou málo selektivní a často může docházet k interakci interferujících látek s cílovými analyty, často je proto nutné zařadit další čistící krok před chromatografickou analýzou. (Čechová, 2012, s. 21-24)



Obrázek 7 Průběh SPE

**Tabulka 1** Sorbenty k přípravě vzorku

Supplier	Product Name	Product Type	Mode	Base Material	Functional Group	Dimensions	Comments
Affinisep	Affini-mip SPE Glyphosate	Cartridge SPE	Molecular imprinted polymer	Polymeric	MIP	3- or 6-mL cartridges	Also available for passive sampling
CTC Analytics	SPME Arrow	Headspace and immersion extractions	SPME	Metal	PDMS, acrylate, carbon, or divinyl benzene	44.0 and 6.28 mm <sup>2</sup> surface, 3.6 and 11.8 µL volume	Thick films allows extraction of wider range of analytes
GL Sciences	MonoSpin	Centrifugal SPE columns	Varies	Silica monolith	C18, aminopropyl, strong cation and anion exchange, phenyl boronic acid, titanium dioxide, amide, weak cation exchange, trypsin, or C18-strong cation exchange	5-µm through pore diameter, 10-µm meso pore diameter, 350 m <sup>2</sup> /g surface, 50–800 mL volume	Designed for small-volume sample treatment
IMCS	Reversed-phase IMCS Tips	Dispersive pipette extraction	Reversed phase	Polymeric or silica	C4 to C18	200 µL, 300 µL, or 1 mL	Turbulent mixing of resin during extraction process provides higher binding capacity
	Ion Exchange IMCS Tips	Dispersive pipette extraction	Ion exchange	Polystyrene or silica	Carboxylic acid, sulfonic acid, secondary or quaternary amines	200 µL, 300 µL, or 1 mL	Turbulent mixing of resin during extraction process provides higher binding capacity
	Phosphopeptide Purification IMCS Tips	Dispersive pipette extraction	Phosphopeptide purification	Metal oxides	Metal oxides	200 µL, 300 µL, or 1 mL	Turbulent mixing of resin during extraction process provides higher binding capacity
	Affinity Purification IMCS Tips	Dispersive pipette extraction	Affinity purification	Modified agarose	Affinity tags (IMAC, Protein A/G)	200 µL, 300 µL, or 1 mL	Turbulent mixing of resin during extraction process provides higher binding capacity
Macherey-Nagel	Chromabond A	Cartridge SPE	Normal phase	Activated carbon		6-mL, 1000-mg polypropylene cartridges	Enrichment of acrylamide from water
	Chromabond PL	Cartridge, 96-well SPE				1-mL cartridge, 30 mg 96 × 30-mg well plate	Removal of phospholipids from biological samples
Millipore-Sigma	Supel Genie	Online SPE cartridges	Reversed phase	Silica	C8, amide, hybrid phase for phospholipid removal	20 mm × 4 mm	Online approach saves cost, prolongs column life
	Supelclean Ultra 2400	Sample cleanup	Varies	Varies	Primary secondary amine, C18, zirconia-coated silica, graphitized spherical carbon	120/108-mg, 1-mL cartridge or 270/225-mg, 2-mL cartridge	Adsorbents provide optimal balance between analyte recovery and interference removal
The Nest Group	BioPureSPN	96-well plate	Reversed-phase desalting	Silica	C18	10–100 µL SPE spin columns	Desalting peptides and polar metabolites in water
Optimize Technologies	EXP Trap columns	On-line and off-line trapping	Sample cleanup, desalting	Fused-core		2, 5, 10, 15, 20, and 30 mm × 1–4.6 mm diameter	Enables removal of detergents or salts, especially for UHPLC

Selektivita sorpce se může výrazně zvýšit při použití imunoextrakce, která je založena na interakci antigen-protilátka. Interakce antigen-protilátka při extrakci polárních látek nezahnují hydrofobní působení, což je jejich výhoda. Při SPE lze využít také disky místo kolon (miniaturizace). Výhodou při použití disků je snížení doby analýzy. (Čechová, 2012, s. 21-24)

Off-line SPE je považováno při přípravě vzorků za velmi efektivní a univerzální, ale její provedení je stále časově náročné a také musíme brát v úvahu její optimalizaci. Při on-line SPE je docíleno několika výhod. Během jednotlivých kroků nedochází ke ztrátám analytu a automatizace znamená minimalizace pochybností.(Čechová, 2012, s. 21-24) I přesto, že má

výhody, limitujícím faktorem může být často vysoká cena zařízení a výrazný vliv matrice. (Čechová, 2012, s. 21-24)

### 3.1 RapidFire

RapidFire je systém založen na SPE, který umožňuje detekci přirozených sloučenin hmotnostní spektrometrií. (Agilent technologies, 2017)

Pomocí RapidFire se provádí přímá kvantifikace nativních produktů a substrátů za cílem získat fyziologicky důležitá data s menším množstvím falešně pozitivních výsledků. (Agilent technologies, 2012)

Kazety RapidFire jsou k dispozici v řadě chemikálií pro širokou škálu vyšetření, aplikace klinického výzkumu. Kazety mají velkou kapacitu vzorku na jednu kazetu. Objemy se pohybují od 4 $\mu$ l až 20 $\mu$ l. Systém RapidFire má šesti štěrbinový výměnný zásobník k automatizovanému zpracování. (Agilent Technologies, 2017)

RapidFire se vyznačuje nižšími náklady a lepším využitím prostředků, menší množství rozpouštědla, méně činidel. Tudiž výsledkem je vysoká produktivita. Ručně lze zvládnout při jednom cyklu pouze 18 desek, automatizací se množství výrazně zvýší na 96 až 384 desek. Pokročilé mapování desek umožňuje dělicí testovací metody pro každou z desek. Využívá se například pro odhalení farmaceutických léků a důležitý je i pro klinické výzkumné laboratoře. Počet desek, které RapidFire zaznamená, je flexibilní. Využívá se automatizovaný měnič 6- kazet a optický snímač k detekci průtoku kapaliny, proto není nutný vysoký počet asistentů. Automatizovaný 6- měnič kazet se využívá více společných kazetových chemikálií za účelem vývoje metod. RapidFire se sjednocuje nejen s jedním MS, ale i s vedoucími třemi nebo čtyřmi hmotnostními spektrometry. Hmotnostní spektrometr může sdílet i s HPLC. (Agilent technologies, 2017)

#### 3.1.1 Spojení RapidFire s hmotnostní spektrometrií

RapidFire ve spojení s hmotnostní spektrometrií umožňuje velmi rychlou analýzu přirozených sloučenin v lidském organismu. Analýza je provedena za 6- 10 sekund/ vzorek bez předchozí úpravy vzorku. V organismu ADME nebo-li absorpce, distribuce, metabolismus a vylučování sloučeniny ovlivňuje hladinu léčiva. Uplatnění nacházíme v klinickém výzkumu a forenzní toxikologii.

Za pomoci RapiFire společně s hmotnostní spektrometrií lze přímo měřit koncentraci intracelulárních sloučenin, během kterého se získají informace o permeabilitě buněk. Dříve



než se analýzy zaměří na zjišťování léků, nejprve předchází fáze porozumění rozdílům mezi aktivitou sloučenin v biochemický a buněčných testech. Běžně se měří pouze odhadem nebo nepřímo propustnost buňky, může být problém, pokud buněčná aktivita je slabá nebo není vůbec. Propustnost se odvíjí také od membránového potenciálu. Analýza je provedena RapidFire a odečítá se koncentrace buněk. Primární prověření testu bylo ve spojení HPLC a tandemové hmotnostní spektrometrie, následně byla analýza přesunuta na RapidFire a hmotnostní spektrometrii. Další úpravy jako miniaturizace a optimalizace byly zavedeny s účelem zjednodušit proces, zvýšit průchodnost vzorku a zkrátit dobu cyklu. Automatizace přinesla poloautomatickou plochu, na které je možné analyzovat až 100 sloučenin za den. Většina léčiv je určena k zachycení specifických cílových molekul uvnitř buněk v cílovém orgánu nebo nádoru. Farmakologická odezva proti intracelulárnímu cíli lékovou molekulou, musí molekula nejprve proniknout do buňky, aby byla dosažena dostatečná koncentrace. Měření penetrace buněk je velmi obtížné a identifikace léčiva v buňce je téměř nemožné. Bylo zjištěno, že je možné použít k detekci koncentrace sloučeniny v buňce kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Citlivost metody je srovnatelná s radiometrickou metodou. RapidFire nabízí rychlé vyčištění vzorku a přenos do hmotnostního spektrometru, proces proběhne během šesti až deseti sekund. (Gordon et al., 2015, s. 156-164)

### 3.1.2 RapidFire typy

Existuje několik typů systému RapidFire. Mezi starší systém patří RapidFire 300/MS, je spojen s trojitým kvadrupólovým spektrometrem.

Prostřednictvím novějšího typu RapidFire 365 lze rychleji a efektivněji poskytovat funkční biochemickou analýzu a stanovení vzorků v biologických matricích. Umožňuje automatizovat zpracování velkých objemů. RapidFire 365 umožňuje přímou enzymatickou detekci analytů bez použití náhrad, nepřímých měření a radioaktivity. Rychlost jednoho cyklu se pohybuje okolo 8 s/ vzorek při objevování léčiv, při klinickém výzkumu je rychlost cyklu 10 s/vzorek. RapidFire 365 stejně jako RapidFire 300 je technologie, která je schopna pracovat se sníženým množstvím vzorku, rozpouštědla, činidel, a tedy vzniká menší množství odpadu. Dále zvyšuje kapacitu analýzy prostřednictvím automatického ovládání 63 desek a až 60 hodin pro 20 000 injekcí bez obsluhy. Zvyšuje produktivitu a efektivnost za časové úspory, automatizované postupy pro vývoj běžných metod a přepínání rozpouštědel pro různé testy v jedné dávce. Tedy lze posuzovat více reakčních produktů vedle sebe. Obsahuje také automatické přepínání kazet do 12 opakovaně použitelných SPE kazet s 2000 injekcemi

na každou kazetu. (Agilent technologies, 2017), (Agilent technologies, 2012), (Biocompare, 2017)

### 3.1.3 Výhody RapidFire

Není potřeba fluorescence ani luminiscenčních substrátů, přítomnost protilátek nebo radioaktivních činidel. RapidFire probíhá desetkrát rychleji než běžná MS.

Ke screeningu celých bílkovin a fragmentů se využívá RapidFire 360. V analýzách s vysokou propustností dochází ke spojení dvou kroků do jednoho, příprava vzorku a sběr dat. Bez použití specifické metody pro konkrétní sloučeninu. RapidFire 360 je schopen zpracovat 96 desek za 15 minut. (Agilent technologies, 2017)



**Obrázek 8** Systém RapidFire/MS

## 3.2 Oasis HLB Prime Sorbenty pro SPE

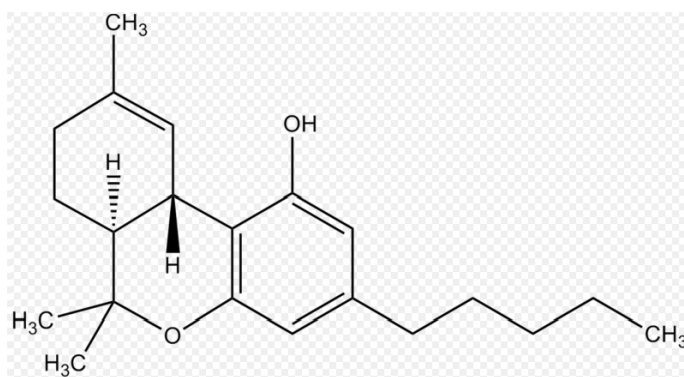
Oasis HLB Prime je prvním sorbentem extrakce na pevné fázi. Je vhodný pro rutinní analýzu. Zajišťuje v kratším čase čistší vzorky. Mezi výhody patří jednoduché dvoustupňové a třístupňové protokoly, rychlejší proudění přes 96 jamek, při kterém nedochází k velkému ucpávání.

### 3.2.1 Online SPE pomocí Oasis

Online Oasis kolony jsou používány k rychlému přečištění biologických vzorků, pro využití k on-line analýzám (LC/ MC, LC/ MS/ MS). (Research instrument)

## 3.3 THC

SPE je využívána například k analýze tetrahydrokannabinolu (THC), též tetra-9-tetrahydrokannabino, který vzniká jako primární metabolit z karboxy-THC. Před vlastním provedením SPE je vzorek krve denaturován pomocí acetonitrilu. Supernatant je následně aplikován na SPE kolonu (například C 18, polymerní sorbenty nebo iontově-výměnné fáze). Sorbent se vzorkem je následně promýván deionizovanou vodou, fosfátovým pufrem. Analyty jsou následně z kolony eluovány ethylacetátem s 2 % přídavkem kyseliny octové (objemové procento  $w = \frac{V_{\text{rozpuštěné látka (l)}}}{V_{\text{roztoku (l)}}$ ). Eluát je odpařen pod proudem dusíku a následně konstituován v příslušné mobilní fázi (50  $\mu\text{l}$ ) pro analýzu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií pozitivní/negativní reakcí. (Elian, 2009, s. 461- 468) Toto spojení nachází časté využití zejména ve forezních toxikologických laboratořích. Konopí je nejčastější droga, se kterou se setkává toxikologická laboratoř. (Elian, 2009, 461- 468) Obvykle se využívá k předzpracování silná kyselina nebo organické rozpouštědlo, jejich použití vede k denaturaci proteinů.



Obrázek 9 THC

### 3.4 Miniaturizace SPE

Miniaturizované podoby, které mají různou modifikaci, se vyznačují nižší spotřebou organických rozpouštědel. Účinnost je stále zachována, ale miniaturizace vede k urychlení analýzy a zejména k šetření organickými rozpouštědly. Miniaturizace extrakce na pevné fázi (MEPS- Microextraction by packed sorbent) je miniaturizace obecně užívané SPE metody. Využívá se k extrakci vzorků o objemu v řádech mikrolitrů. (Moein et al., 2014, s. 1-15) Princip je založen na sorpci testované látky na sorbent. Sorbent, se nachází v upravené stříkačce. Sorbentu je vkládáno a utěšňováno přibližně 1 až 2 mg. Nejprve se vzorek nasaje do stříkačky, poté je promýván příslušnými roztoky a nakonec je eluován ze stříkačky nejčastěji modifikovaným organickým rozpouštědlem. (Goliáš, 2013, extrakční techniky) MEPS je možné online spojit s GC nebo LC bez úprav. Metoda MEPS se používá například pro stanovení lokálních anestetik v lidské plazmě. (Monein et al., 2014, s. 1-18)

Extrakce probíhá ve standardních krocích jako u SPE. První fáze je extrakce, poté následuje aplikace vzorku, promývání a na závěr eluce. V této metodě jsou objemy rozpouštědla i vzorku redukovány v porovnání s SPE technikou. (Monein et al., 2014, s. 1-18) Techniku lze použít k extrakci široké škály léčiv a metabolitů v biologických tekutinách (krev, moč, plazma). (Monein et al., 2014), (Vijayaraj et al., 2013, s. 2-6)

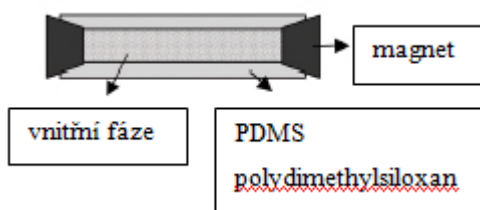
### 3.5 Modifikace SPE

#### 3.5.1 SBSE

Mikroextrakční techniky tuhé fáze mají i své modifikace, jednou z nich je stir-bar sorptive extraction (SBSE) neboli sorpční extrakce na míchadélku. (Vijayaraj et al., 2013,

s. 1-7) Charakteristikou sorpční extrakce je, že do roztoku se vkládá míchadlo (twister), které je magnetické. Povrch míchadla je tvořen sorpční fází, polydimethylsiloxany jako nepolární, středně polární na bázi polyetylen glykolu a polární methylnakrylátu, vkládá se přímo do kapalného vzorku, kde jsou cílové analyty sorbovány na povrchu míchadélka obsahující příslušnou pevnou fázi. (Čechová, 2012, s. 25), (Plíšek, 2015, s. 71) Doba, potřebná k dosažení rovnovážného stavu, se pohybuje okolo 60 min, ale závisí na množství vzorku a rychlosti míchání. (Plíšek, 2015, s. 71), (Goliáš, 2013, extrakční techniky) Technika se používá pro zakoncentrování těkavých a mírně těkavých organických sloučenin. (Goliáš, 2013, extrakční techniky)

Technika SBSE má vysokou extrakční účinnost ve srovnání s mikroextrakcí na pevné fázi (SPME- Solid phase microextraction), ale nevýhodou je delší extrakční čas. Technika je hlavně účinná ve spojení s následnou plynovou chromatografií (GC- MS) při ekologických analýzách. Metoda SBSE v porovnání s SPME je citlivější. Kombinace s GC- MS se využívá pro léčiva v biologických vzorcích. Výhodou jsou kvantitativní extrakce, látek s poměrně nízkými detekčními limity v příslušném biologickém vzorku. (Goliáš, 2013, extrakční techniky)



**Obrázek 10** Dvofázové zařízení SBSE

### 3.6 QuEChERS

V současné době je poptávka po vysoce výkonných metodách, které jsou snadno proveditelné. Technika zahrnuje mimo jiné dělení kapalina- kapalina za použití acetonitrilu. QuEChERS má výhody oproti běžné extrakci, umožňuje získat výsledky pro širokou škálu analytů. Přesné výsledky se získají v přítomnosti vnitřního standardu, který minimalizuje chyby. Jedním analytem lze extrahovat 10- 20 vzorků za 30- 40 minut. (Rejczak et al., 2015)

V QuEChERS anglická zkratka, v překladu se jedná o rychlou, efektivní, levnou a velmi bezpečnou metodu. Metoda QuEChERS se využívá již po celém světě. Laboratoř získá běžně 8 vzorků za 45 minut za obsluhy jednoho analytika a v průběhu procesu v porovnání

s jinými metodami nedochází k velkému množství odpadu a má menší náchylnost k chybě. Skládá se z několika kroků, konkrétně z extrakce a přečištění. (CVU Stuttgart, 2011)

QuEChERS je jednoduchá dvoustupňová extrakční technika. Prvním krokem je rozpuštění vzorku. Vzorek se rozpouští v acetonitrilu. 1 gram vzorku je rozpuštěn v 1 mililitru acetonitrilu. Druhým krokem je takzvané vysolení. Proces je vyvolán přidáním soli a pufrů. Přidá se síran hořečnatý ( $MgSO_4$ ) a chlorid sodný (NaCl) nebo octan sodný, tím je vyvolána separace fází. Sůl se musí přidat až po promíchání směsi vzorku a acetonitrilu, protože by docházelo k exotermním reakcím. Mohlo by docházet až k degradaci vzorku, a poté čistící disperzní extrakce pevné fáze. QuEChERS 2007.01 využívá 1% roztok kyseliny octové a octanu sodného, na rozdíl od starších QuEChERS metod, kde se používal NaCl. Další novější metodou je EN-15662 EU, využívá slabý pufrovací systém, který je složen z 1 g citrátu sodného a 0,5 g citrátu disodného při pH 5,5. I přesto, že se jedná o podobné extrakce, nalézáme drobné odlišnosti, rozdílná hmotnost vzorku nebo objem rozpouštědel. K zamezení chyb se přidává vnitřní standart.

Následně probíhá extrakce acetonitrilem, který je úvodním krokem disperzní extrakce pevné fáze. Pro správné provedení extrakce musí být zajištěna malá spotřeba rozpouštědel. Část extraktu je přidán do centrifugační zkumavky, která obsahuje malé množství SPE sorbentu a následně se směs protřepe, aby se zvýšilo rozmístění SPE sorbentu a aby proces čištění byl usnadněn. Disperzní extrakce pevné fáze se od klasické SPE liší tím, že se využívají kazety, které obsahují různé množství a typy sorbentů. (Rejczak et al., 2015) Po protřepání následuje přečištění, odstranění organických kyselin. V průběhu posledního kroku se smísí nezpracovaný extrakt se sorbentem (C 18). Ve spojení s C18 se využívají diaminy, které mají podobnou funkci jako oxid křemičitý. Následuje přečištění pomocí extrakce disperzní tuhé fáze. Extrakt se přidá k disperzní čistící sadě, minutu se promíchá na vortexu, aby se rozložil volný materiál. Aby se snížila doba promíchání, urychlují je keramické homogenizátory. Jsou to neporézní tyčinky, které zajišťují těsný kontakt mezi vzorky a extrakčními chemickými látkami. Potom následuje centrifugace (5 minut, 4 000 otáček/ minutu). Dojde k separaci fází, oddělení od supernatantu. Po centrifugaci (4 000 otáček/ minutu po dobu 5 min) supernatant vstupuje do GC/ MS nebo LC/ MS. V disperzní extrakci pevné fáze je volen sorbent, aby byla zachována matrice a analyty, aby zůstaly v kapalně fázi. (Agilent Technologies, 2013)

Disperzní extrakcí pipetami se provádějí rychlé extrakce, kdy sypký sorbent se nachází ve špičce pipety s minimálním použitím rozpouštědla. Tyto extrakční metody lze poměrně snadno automatizovat. Některé biotechnologické společnosti, například Integrovaný systém

mikrochromatografie, vyvinula disperzní produkty s čtyřmi odlišnými fázemi. Silné nebo slabé aniontové nebo kationtové výměníky je možné umístit na křemičitany nebo polystyren. Na agaróze jsou k dispozici sorbenty s reverzními fázemi (od C4 do C18). (Douglas, 2017)



**Obrázek 11** Přidání acetonitrilu



**Obrázek 12** Centrifugace



**Obrázek 13** Vialky pro GC nebo HPLC analýzu

K léčbě mnoha život ohrožujících nemocem patří rakovina, tuberkulóza, malárie a další, je potřeba rychlé a snadno použitelné diagnostické přístroje pro detekci biomolekul. V oblastech mikrofluidik a nanotechnologie dochází k technickým pokrokům.

Novou příležitostí je vývoj nové technologie Lab-on-a-chip, který umožňuje provést kompletní sadu biochemických testů. (Dak et al., 2016, s. 1-11)

## 4 Mikroextrakce

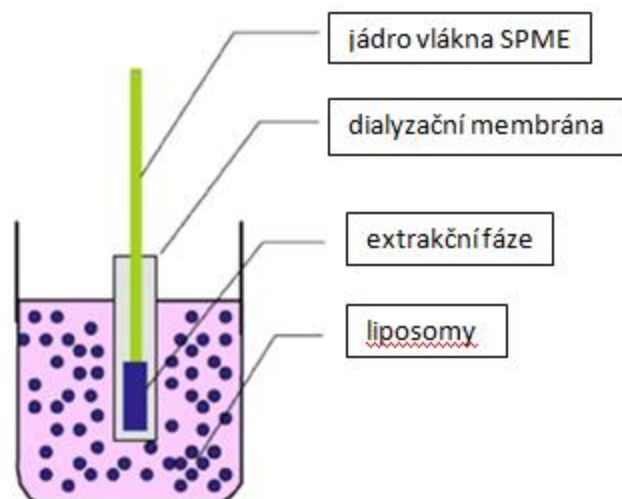
Mikroextrakční techniky se dnes běžně využívají z důvodu časové nenáročnosti, dále protože snižují pořizovací a provozní náklady. Mikroextrakce nabízí zjednodušení a z automatizování procesu. Během vývoje došlo ke sloučení analytických kroků (izolace, přečištění extraktu) do jediného kroku. (Goliáš, 2013, extrakční techniky) Při extrakcích se minimalizovalo množství používání organických rozpouštědel. Pro výzkumníky při vývoji mikroextrakce bylo účelem získat techniku, kterou je možné použít v terénu (izolace sloučenin), a poté v laboratoři provést analýzu získaného extraktu. (Goliáš, 2013, extrakční techniky) Při provádění této techniky je třeba dodržovat podmínky, abychom dosáhli co nejvíce přesné výsledky i při nízké koncentraci vzorku. (Goliáš, 2013, extrakční techniky) Mezi mikroextrakčními technologiemi patří mikroextrakce na tuhé fázi (SPME) a kapalnou fázi (LPME). (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)

### 4.1 Mikroextrakce na pevné fázi

Na začátku 90. let byla metoda SPME navrhla Janusze Pawliszyna a jeho pracovníky na Univerzitě ve Waterloo. (Goliáš, 2013, extrakční techniky) Před 20 lety byly použity pro přípravu vzorku různé analytické techniky. Mezi techniky patří například kapilární plynová chromatografie. (Moein et al., 2014, s. 1)

SPME (Solid Phase Microextraction), extrakce je založená na rozdělení analytu mezi organickou fází na taveném křemenném vlákne a matici. (Moein et al., 2014, s. 1). SPME je označován jednoduchý proces, který nevyžaduje rozpouštědlo ani složité aparatury. Metoda je citlivá a rychlá a vykazuje poměrně vysokou přesnost. V této technologii je spojen odběr vzorku, extrakce, koncentrování a aplikace vzorku. SPME závisí na distribuční rovnováze, rovnováha mezi vzorkem a nemísitelnou kapalnou fází, která je nanesena na pevný nosič. SPME se využívá také v sestavě kombinující principy dutého vlákna pevné fáze a míchací tyčinky sorpční extrakce. (Moein et al., 2014, s. 1-14)



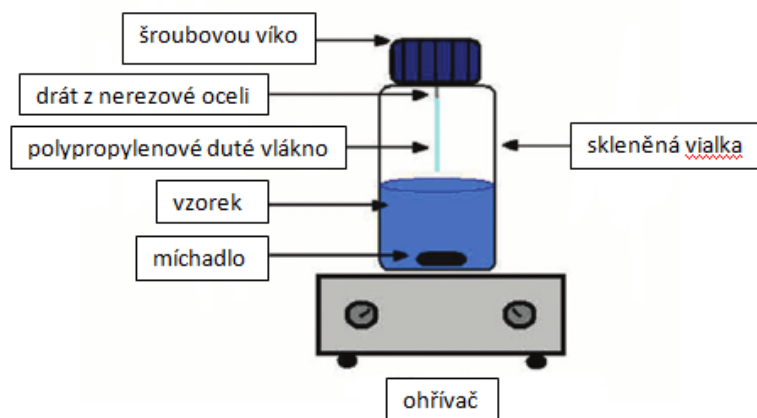


**Obrázek 14** Schéma SPME chráněné membránou, používáno Pawliszyn a Musteata

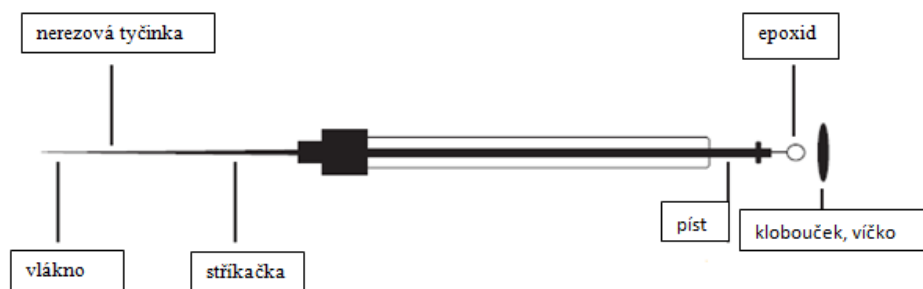
#### 4.1.1 Využití

Mikroextrakce na pevné fázi je technika, která je rozšířena do mnoha oblastí jako je životní prostředí, přírodních produktů, farmacie, biologie a soudního lékařství, dále pro analýzu potravin, v bioanalýze a toxikologii. (Atarri et al., 2014, s. 1-2) SPME slouží například pro úpravu vzorku pro stanovení antiestrogenů v biologických vzorcích, klenbuterolu v lidském séru a moči, pro stanovení sloučenin produkovaných rakovinnými buňkami bakteriemi. (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)

SPME je možné využít přímým ponořením vlákna do vzorku nebo zavedení vlákna ve vzorku headspace k extrakci těkavých látek, které jsou rozděleny mezi plynnou a kapalnou fází.



**Obrázek 15** Schématické znázornění HS- SPME



Obrázek 16 SPME stříkačky- složení

Headspace mikroextrakce na pevné fázi (HM- SPME) je v systému zapojen nad vzorkem plynná fáze. Sorpce látek s funkčními skupinami (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -OH) ovlivňuje změna pH. (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)

#### 4.1.2 Faktory ovlivňující SPME

Mnoho faktorů ovlivňuje konstantní rovnováhu, mezi ně patří například pH, teplota. Ve vyšších teplotách dochází k rychlejšímu ustavení rovnovážného stavu. Dále mikroextrakci na tuhou fázi ovlivňuje iontová síla, roste s rostoucí polaritou sloučenin. (Goliáš, 2014, Extrakční techniky) *V přítomnosti solí se extrakční výtěžek zvyšuje, ale pouze do určitého maxima, pak se každým dalším přidavkem výtěžek snižuje. Pokud by koncentrace soli byla větší, docházelo by ke zkracování životnosti vláken. Při výběru sorpčního vlákna je důležité dbát, aby polarita vlákna byla blízká polaritě extrahovaných sloučenin. Extrakce je ovlivněna teplotou, při vyšších teplotách dochází k zvýšení koncentrace těkavějších složek v plynné fázi, zároveň se zvyšuje riziko tepelné desorpce.* (Goliáš, 2013, extrakční techniky)

#### 4.1.3 SPME vlákna

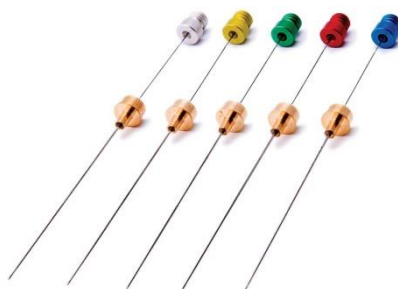
V dnešní době je komerčně k dispozici několik typů SPME vláken. Nedostatkem některých vláken je nesprávné chemické spojení se stacionární fází a tloušťka běžných vláken je relativně silná. Běžně používaná polymerní vlákna jsou drahá a mají omezenou životnost, proto byly vyvinuty nové techniky, které nahrazují konvenční vlákna SPME. (Omanovic et al, 2014, s. 6629- 6634) Křemenné vlákno je lokalizováno uvnitř kovové jehly. Jehla slouží k mechanické ochraně před poškozením vlákna a další funkce je propíchnutí septa v zátce

vialky, ve které se nachází matrice. Vlákno je pokryto polymerem. (Goliáš, 2013, Vzorkování metodou SPME)

Životnost vlákna je poměrně složité definovat. Životnost, dostupnost a cena vláken jsou problémy, které lze snadno překonat pomocí chemické technologie sol-gel, která jednoduchým způsobem syntetizuje nové materiály a soustředí se na vrchní vrstvu vláken. Metoda se používá pro přípravu SPME vláken. V poslední době se studie zabývají vlákny pro SMPE a využitím předkoncentrování biologických nebo kontaminovaných vzorků z životního prostředí. Při navrhování vláken je důležité se zaměřit na parametry a vlastnosti vláken (stabilita, tloušťka, polarita, povrch nebo schopnost absorpce). Vysokomodulové (HM) vlákno obaluje kapilárky. (Omanovic et al., 2014, 6629-6635) Efektivnost obalové hustoty pro účinnou extrakci se pohybuje mezi 26% a 52% s hustotou v průměru 11,5  $\mu\text{m}$ . (Monein et al., 2014, s. 2)



Obrázek 18 SPME vlákna



Obrázek 17 SPME vlákna

#### 4.1.4 Sol-gel

Sol-gel metoda patří mezi povrchové rozvíjející metody, poskytuje syntetický postup jak pro anorganické, tak i organicko-anorganické hybridní materiály. Pro zvýšení citlivosti a senzitivity mohou být syntetizovány různé materiály. Tento proces sol-gel probíhá v mimořádně mírných podmínkách, takže produkuje výrobky různé velikosti, tvarů a forem. (Atarri, 2014, s. 2) Sol-gel poskytuje vysokou tepelnou stabilitu polymerních struktur a je možné kontrolovat tloušťku povrchu. (Monein et al., 2014, s. 2- 4)

V dnešní době je věda zaměřena na vytváření kombinací uhlíkových nanotrubic (CNTs) se sol-gel technologií. CNTs se jedná o alotropii grafitového uhlíku. Nanotrubičky se vyznačují velkým povrchem, schopností vytvořit  $\pi$ -  $\pi$  vazby a výbornou mechanickou, tepelnou i chemickou stabilitou. Příprava sol-gel vláken se skládá z několika kroků. Jeden

z kroků je předúprava roztaveného křemenného povrchu, dále příprava sol- gel roztoku a další.

Pro charakterizaci adsorpčních sil nanočástic se využívá mikroextrakce s pevnou fází a plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií. Výsledky, produkty, nanotechnologie vyvolávají obavy o nežádoucích účincích na zdraví člověka a životní prostředí. Toto téma je předmětem mnoha diskuzí. Pro určení interakce nanočástic s biologickými systémy jsou důležité povrchové vlastnosti nanočástic. Pouze některé vlastnosti lze změřit a jsou omezeny na specifický povrch a povrchové složení. Především vlastnosti se velmi zřídka váží k charakterizaci interakce biologického materiálu. Využívá se index povrchu biologického materiálu (BSAI), který byl vyvinut za účelem identifikovat a kvantifikovat vzájemné působení sil, které ovlivňují vlastnosti absorpce biomolekul (peptidy, proteiny) na nanočástice. (Omanovic et al., 2014, s. 6629-6635)



**Obrázek 19** Přechod sol-gel

#### 4.1.5 Automatizace SPME

Automatizovanou verzí SPME je technika in-tube SPE. Novinka SPME je založena, na mikroextrakci, při které se nachází pevná fáze v kapiláře. Principem této techniky je, že kapalný vzorek je přímo extrahován uvnitř kapiláry na stacionární fázi, a poté je analytem mobilní fázi desorbován. Po dosažení rovnováhy se vlákno zatáhne a celá jehla se vytáhne ze vzorkové matrice. Ke stacionární fázi uvnitř kapiláry mají analyty mnohem nižší afinitu než k rozpouštědlu, k němu je afinita větší. In-tube SPME je online spojena s LC pro automatickou analýzu méně stabilních sloučenin nebo s GC. (Čechová, 2012, s. 24-25)

## 4.2 Mikroextrakce kapalnou fází

Další výhodnou technikou, která minimalizuje množství potřebného organického rozpouštědla (akceptorové fáze) je mikroextrakce kapalnou fází. *Mikroextrakce kapalnou fází se využívá například pro analýzu nikotinu ve slinách, amfetaminu, diuretik v moči nebo progesteron v lidském séru a další.*

Na počátku byla použita extrakční fáze kapka n-oktanu, která je zavěšena na teflonové tyčince a ponořena do vodného roztoku (donorové fáze). Teflonová tyčinka je z roztoku vyjmuta a mikrostříkačkou je nadávkována do plynového chromatografu organická fáze. Technicky byla SDME (mikroextrakce jednou kapkou) příliš složitá, proto byla zjednodušena, trubička se nahradila hrotem mikrostříkačky, rozpouštědlem o malém objemu 1- 5 ml jsou kapky zavěšeny na hrotu mikrostříkačky. Sloučeniny, které jsou stanoveny, jsou extrahovány do kapky po určitou dobu a za dané teploty. Extrakt, který se získá, je analyzován vhodnou analytickou metodou. Při SDME nedochází k přenosu analytů do dalších následných analýz (carryover), protože se používá ke každé extrakci nová fáze. SDME je vhodná pouze pro kombinaci vodných vzorků (vyšší polarity) a nemísitelného extrakčního organického rozpouštědla. Pokud bychom chtěli použít kapalnou mikroextrakci k těkavějším sloučeninám, museli bychom využít headspace uspořádání, protože během extrakčního procesu může docházet během procesu k odpařování rozpouštědla. Headspace a přímé uspořádání má dobrou reprodukovatelnost, není potřeba desorpčního zařízení, protože je celý extrakt analyzován. Jinou variantou může být dynamická mikroextrakce (extrakce probíhá na hrotu i uvnitř mikrostříkačky). (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)

### 4.2.1 Princip techniky

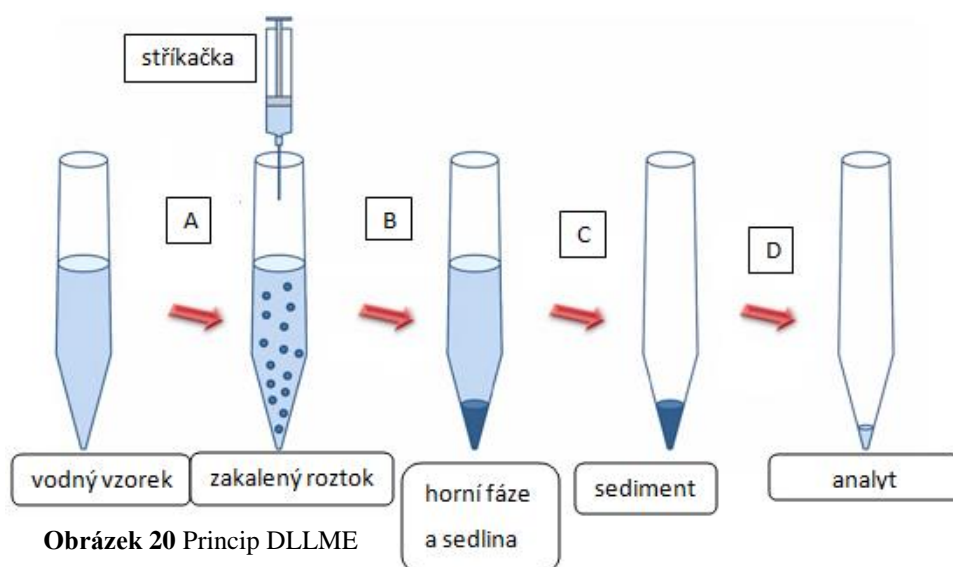
Extrakční fázi tvoří organické rozpouštědlo, které vytváří na vnitřních stěnách mikrostříkačky tenký film, následuje natažení vzorku. Po dosažení rovnovážného vztahu je vzorek vytlačen z mikrostříkačky a analyt převeden do celého objemu rozpouštědla. Při dynamickém uspořádání, manuálním provedení má zhoršenou reprodukovatelnost, protože na stěnách uvnitř mikrostříkačky se tvoří nepravidelný film, tento problém je zčásti vyřešen automatizací celého procesu. Mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují mikroextrakci na jednu kapku, patří vhodná volba extrakčního rozpouštědla. Rozpouštědlo musí být nemísitelné s vodným vzorkem, při headspace aplikaci musí mít nízkou těkavost.

(Goliáš, 2013, Extrakční techniky) Důležité je porovnat účinnosti extrakce, jaké množství organické fáze se ztratí při částečném rozpuštění či odpaření nebo toxicita a čistota.

V plynném prostoru, kde dochází k odpařování, nebo vlivem z části rozpuštění vzorku není kapka rozpouštědla konstantní. Při větším objemu kapky je zhoršená manipulace. Pokud je extrakční teplota vyšší, dochází k odpařování kapky poměrně rychle, ale v plynném vzorku se zakoncentrují těkavější analyty. Existují modifikace jako disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (Dispersive Liquid– Liquid Microextraction) DLLME. (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)

#### 4.2.2 Modifikace DLLME

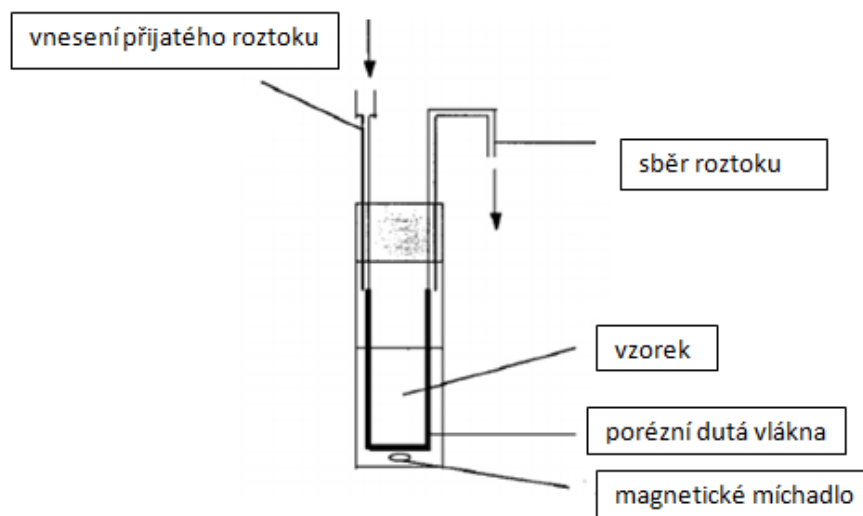
DLLME se používá ke stanovení organických sloučenin ve vodě. Jedná se o metodu, která je založena na trojitěm systému rozpouštědel. DLLME patří mezi jednoduché, rychlé metody s vysokou výtěžností a nízkými náklady. Princip metody je založen na prudkém vstříknutí směsi extrakčního a dispergujícího rozpouštědla (např. tetrachlorethylen- aceton) do vodného vzorku, který je umístěn ve vzorkovací nádobce kuželovitého tvaru. Dochází k tvorbě jemných kapiček extrakčního rozpouštědla, které jsou v roztoku vzorku rozptýleny. Plocha fázového rozhraní mezi vzorkem a rozpouštědlem při interakci analytů s extrakčním činidlem je extrémně velká díky jemným kapičkám, které vznikají. Směs je po extrakci odstředěna a dochází na dně vzorkovací nádobky k sedimentaci. Sloučeniny v extrakční fázi, které sledujeme, jsou dále analyzovány instrumentální technikou. (Goliáš, 2013, Extrakční techniky)



A- Rychlé vstříknutí směsi dimethylsulfoxid a chlorbenzen, B- Ultrazvuk 20 min, Centrifugace 20 min, C- Oddělení sedimentu, D- Vysušení slabým proudem dusíku

#### 4.2.3 HF-LPME

Další modifikovanou mikroextrakcí využívá duté vlákno, které je naplněno vhodnou sorpční vrstvou (Hollow-Fiber Liquid- PhaseMicroextraction). HF- LPME je vhodná pro kapilární elektroforézu, ale i modifikovaná pro chromatografické metody. Během extrakčního procesu extrakční kapalina neproniká do vzorku, tedy je mechanicky chráněná. Pro extrakci vzorku se zvolí takové pH, aby docházelo k co největšímu potlačení ionizace extrahovaných látek, tím dochází ke snížení rozpustnosti ve vodě. Sledované sloučeniny jsou z donorové fáze (vzorku) extrahovány do organické fáze, která je s vodou nemísitelná a imobilizovaná v pórech dutého vlákna. Sledované sloučeniny jsou následně extrahovány do rozpouštědla akceptorové fáze (uvnitř dutého vlákna). (Goliáš, 2013, Extrakční techniky), (Čechová, 2012, s. 26-27), (Plíšek, 2015, s. 64-66)



**Obrázek 21** Schéma uspořádání HF-LPME

## 5 Extrakce na kapaln  fázi

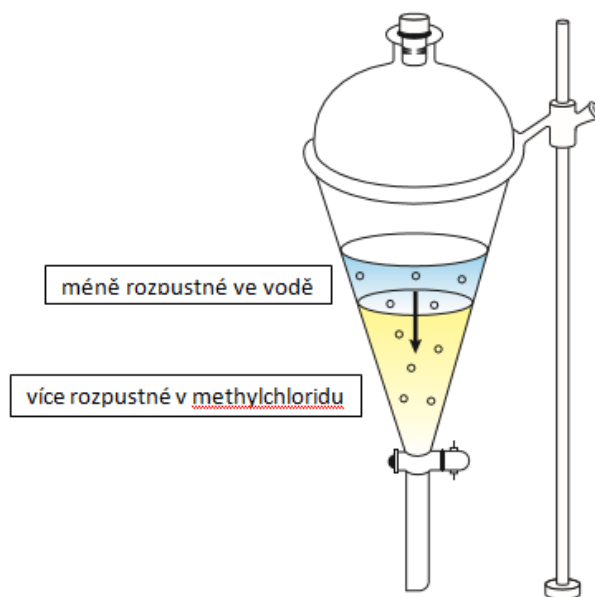
LLE patří mezi klasickou separaci z kapaliny do kapaliny, v současn  době je využívána velmi zř dky z důvodu náročnosti a velkého objemu organických rozpouřt del, ale i přesto metoda poskytuje poměrně přesn  výsledky. Souasně vzniká toxick  odpad, který zatěřuje životní prostředí. Vyznačuje se nízkou selektivitou a citlivostí. Může se pouřit k odstranění nečistot z rozpouřt dla (nejčastěji vodn  roztok), druh  rozpouřt dlo je nem siteln  s vodou (organick ). Typick  rozpouřt dla pro LLE jsou například alifatick  uhlovodíky, ethery, estery nebo chloroform. Vytv r  dvě ohraničen  vrstvy, m sen  vody například s etherem, chloroformem nebo benzenem. Poté co je ustavena rovnováha, poměr koncentrace rozpuřt n  látky je nalezen jako konstantní, coř je vyjádřeno Nernstovým distribučním zákonem. Nernstův distribuční zákon platí tehdy, kdyř je sloučenina rozdělena mezi dvě nem siteln  rozpouřt dla způsobem, ře poměr koncentrací je v obou fázích konstantní. Aby byla extrakce  spěšn , musí být přítomny vhodn  podmínky- pH, teplota, dále závisí na poměru fází a typu rozpouřt del. LLE se nahrazuje SPE pro kapaln  vzorky. Výhodou této metody je sniřov n  spotřebny organických rozpouřt del, tud ř čas analýzy je kratř  a je mořn  ji automatizovat. Čast  vyuřit  m  tato technika zejména k přečiřtění a zkoncentrov n  chemických sloučenin pro jejich následnou purifikaci. (Pl šek, 2015, s. 55), (Čechová, 2012, s. 21- 24, 28- 30)

Nernstova rovnice

$$E_x = E_{X^+/X}^\circ + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[X^+]}{[X]}$$

$E_x$	Elektrochemick� potenciál iontu X (V)
$E_{X^+}^\circ$	Standardn� redoxn� potenciál p�ru $X^+/X$
R	Univerz�ln� plynov� konstanta [8,314 472 J/mo·K]
T	Teplota v Kelvinech (K)
n	Počet vyměněných elektronů
F	Faradayova konstanta [96 485 C/mol]
$\ln$	Př�rozen� logaritmus
$[X^+]$	Koncentrace oxidovaných iontů
$[X]$	Koncentrace pevn� fáze





**Obrázek 22** Provedení LLE v dělicí nálevce

## 6 HPLC sorbenty

Vhodná příprava vzorku jde ruku v ruce s vhodně zvoleným sorbentem pro separaci daného testovaného analytu. Protože nejčastější separační technikou pro analýzu nízkomolekulárních látek (léčiva, biologicky aktivní látky jako například vitamíny, hormony) je HPLC, zmíním se okrajově v této kapitole i o moderních trendech v oblasti chromatografických sorbentů. Současné trendy při vývoji HPLC sorbentů se zaměřují na porézní a neporézní sorbenty. U sorbentů musí být dosažena vysoká separační účinnost, která je spojena s morfologií porézních částic, jejichž povrch je většinou tvořen difúzními póry. Po zmenšení velikosti částic, ze kterých se skládá sorbent, se zlepší inter- i intrapartikulární přenos hmoty. V porézní částici dochází k interakci mobilní a stacionární fáze. Rozpuštěná látka putuje z pohybující se mobilní fáze do stagnační a následně do stacionární fáze. Ze stacionární fáze je analyt znovu uvolněn a difunduje zpět do pohyblivé fáze. Tento proces se mnohokrát opakuje, a tím dochází k prostupu analytu skrz kolonu. Čím menší použití zrn sorbentu, tím je difúzní proces rychlejší. (Sýkora a kol., 2007, 190- 191)

Aby došlo k přenesení hmoty ve stacionární fázi rychleji, je vhodné využít neporézní sorbenty. Neporézní materiály se skládají ze silikagelových nebo polymerních částic. Částice mají rozměry přibližně 2  $\mu\text{m}$ . V tenké vrstvě na povrchu mikročástic se nachází nanosená stacionární fáze, která umožňuje velmi rychlý přenos hmoty s vysokou účinností i při dělení syntetických polymerů, biomakromolekul při velkých průtocích mobilní fáze. Ovšem tyto sorbenty nejsou vhodné k preparativnímu dělení, protože sorbenty je možné poměrně snadno přetížit. Další nevýhodou jsou malé rozměry částic sorbentu, díky tomu se generuje na kolonách vysoký tlak, vyšší než na porézních sorbentech. (Sýkora a kol., 2007, 191)

Nepropustná jádra sorbentů bývají větší, přibližně 5  $\mu\text{m}$ , a jsou podobné neporézním sorbentům, jedná se o povrchově porézní sorbenty. Jejich účinnost může dosahovat i lepších výsledků než na porézních materiálech. Tlaky na kolonách, které se naplní tímto materiálem, jsou nižší, naopak větší jsou možné sorpční kapacity než na kolonách s neporézním materiálem. (Sýkora a kol., 2007, 191)



Obrázek 23 HPLC sorbenty

## 7 Monolitické kolony

Monolitické kolony se používají zejména v oblasti HPLC. Monolity patří mezi zvláštní separační médium. Monolitické kolony se připravují polymerováním vhodných monomerních jednotek do bloku porézního polymeru, který vyplní vnitřek separační kolony, a plní tak v koloně funkci stacionární fáze. (Sobotníková a kol., 2010, s. 1230) K přípravě kolon se používají polymery a kopolymery. Mezi monolitická média patří makroporézní monolitické disky. (Sobotníková, 2010, s. 1229- 1230) Disky jsou výhodné k rychlé separaci biomolekul. Komerční disky jsou připravovány z reaktivních monomerů (glycidylmethakrylátu), které následně podléhají chemické modifikaci. (Mayadunne et al., 2014, s. 565-567)

Monolitické kolony se vyznačují vysokou propustností, z toho vyplývá výborný přenos hmoty, což vychází z toku přes póry. Ve srovnání s kolonami s mikročásticemi, které mají pomalý difúzní přenos hmoty v porézních částicích, se mezi částicemi nachází velký volný prostor. Plocha polymerních monolitických kolon je nízká při použití gradientu směsi v HPLC a ideální pro separaci biopolymerů. Monolitické kolony v HPLC jsou dobře propustné při zvýšení rychlosti průtoku a mechanicky stabilní, tedy zajišťují účinnou separaci. (Mayadunne et al., 2014, s. 565-568)

I pro extrakci na pevné fázi se používají i monolity, které jsou kovalentními vazbami ukotveny ke stěnám kapiláry. Organické polymerní monolity jsou pH stabilní, ale mají nízký povrch, který může omezit SPE. Aby nedošlo k omezení techniky, nanočástice se přidávají do polymerační směsi, a poté jsou silnou bází odstraněny. (Zhang, 2015, 1-3)

Využití monolitických sorbentů nachází uplatnění i v analýze a fluorescenční detekci proteinů, kdy se uplatňují monolitické sorbenty v tzv. mikrofluidních systémech. Ty jsou připravovány v mikrokanálcích fotopolymerací. Vlastnosti monolitů jsou upravovány změnami jejich složení a koncentrace, aby byl zlepšen průtok a extrakce. Proteiny jsou značeny čipem v přítomnosti monolitů s napětím a inkubace fluorescenčního barviva. Následně jsou značené proteiny eluovány za použití napětí na rezervoáru na mikrozařízení, a pak jsou detekovány laserem indukovanou fluorescencí. Monolity z oktylmetakrylátu vykazují na retenci proteinů. Poté následuje automatická čipová extrakce a fluorescenční značení proteinů. Tato technika zaznamenává neustálý vývoj a směřuje postupně k využívání bioanalytických mikročipů k detekci biomarkerů. (Yang et al., 2015, s. 737-738)

## 7.1 Druhy

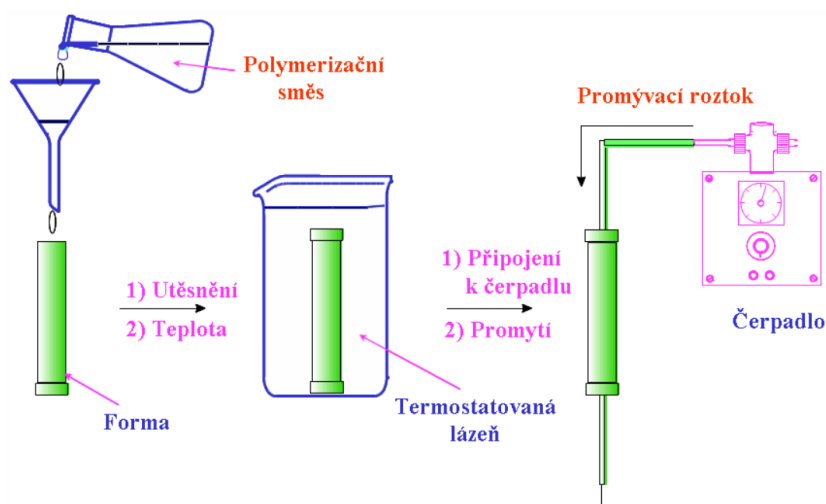
### 7.1.1 Monolit oktadecyl

Kolona ODM byla vyrobena z polymerační směsi se stejným složením jako kolony kapilární elektrochromatografie. V CEC mobilní fáze díky elektroosmotickému toku může proudit v úzkých kapilárách, což znamená, že rozpuštěná látka prochází skrz kolonu s menší hmotností než u HPLC. Při HPLC mobilní fáze se pozastavuje v úzkých kolonách a vyvolává odpor průchodu mobilní fáze. Poté byla snaha vytvořit kolony, které by byly dostačující pro funkci HPLC. Stejně složení rozpouštědel pro monolity CEC ani HPLC není vhodné (Mayadunne et al., 2014, s. 565-571)

V rámci vývoje ODM kolon byl poměr rozpouštědel upraven nejprve takto: složení bylo sníženo na 53,58 hmotnostních procent cyklohexanolu a 21,8 hm% ethylenglykolu se zachováním procent vody. Nově označené kolony ODM-1 se v separačních vlastnostech (protein, alkylbenzen) nijak výrazně neliší od ODM. Dalším vývojem došlo opět ke snížení koncentrace cyklohexanolu 52,4 hm% a naopak zvýšení koncentrace ethylenglykolu na 22,9 hm%. Při vyhodnocení separace proteinů s takto připravenou kolonou ODM-2 se ukázalo, že píky analytů jsou užší než u předcházejících kolon, ale tato kolona není vhodná pro separaci alkylbenzenů. V porovnání s ODM-1, ODM-2 vykazuje vyšší retenční faktor pro alkylbenzeny. Čtvrtý model kolon ODM-3 byl připraven snížením hexanolu na 51,5 hm% a opět zvýšením obsahu ethylenglykolu na 23,8 hm%, ostatní složky v polymerační směsi zůstaly bez jakéhokoliv zásahu. Kolona ODM-3 se ukázala jako ideální pro separaci alkylbenzenů (vyhovující tvar píků), pokles separační kvality byl ale viditelný u proteinů. Dalším snižováním obsahu jak cyklohexanolu, tak zvýšením ethylenglykolu v polymerační směsi, docházelo ke snižování separace alkylbenzenů a proteinů a pórovitost se zvýšila. Změny v obsahu složení mohou způsobit změny v morfologii ODM kolon. ODM-2 jsou nejvhodnější pro separaci proteinů, proto k nim byly postupně začleněny uhlíkové nanotrubicе za účelem obměnění retenčních vlastností monolitu. Avšak přidané množství musí být přiměřené, jinak by došlo ke snížení propustnosti a ucpání pórů. Optimálním se zdá být vložení 12,5 mg nanotrubic v rámci jednoho monolitu. (Mayadunne et al., 2014, s. 570-573)

### 7.1.2 Příprava polymerní monolitické kolony

Pro přípravu stabilních makroporézních polymerních monolitických kolon je nutné naplnit trubici směsí monomerů, radikálového iniciátoru a monomerů. Poté je trubice uzavřena a utěsněna a následně je provedena polymerace při teplotě, která je neustále kontrolována. Na závěr, kdy koncová těsnění jsou vyměněna za standardní koncovky pro HPLC, je kolona k separačnímu systému připojena. Látky, které nezreagují, jsou vhodným rozpouštědlem vymyty. Klasické HPLC kolony jsou nerezové, ale polymerace probíhající v koloně jsou typické pro kapilární kolony. S těmito kolonami se pracuje ve spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. (Sýkora a kol., 2007, s. 197-198). Polymerací styrenu nebo divinylbenzenu dochází k vytvoření stacionární fáze, která je využita pro RP- HPLC proteinů a peptidů. (Sobotníková a kol., 2010, s. 1226-1231)



Obrázek 24 Příprava polymerních monolytických kolon

### 7.1.3 Tubulární kolony

Mezi monolitické kolony patří také tubulární kolony s radiálním tokem. Jedná se o kolony, které jsou tvořeny trubicí a stěny jsou tvořeny monolitem. V radiálním směru prochází přes stěnu mobilní fáze a analyty. Kolony mají objem až kolem 10 litrů. Tubulární monolitické kolony jsou využity k separaci oligonukleotidů nebo proteinů. Tyto kolony se nepoužívají pro preparativní separaci. Při radikálové polymeraci v koloně dochází k exotermnímu procesu, při kterém se uvolní velké množství tepla. Odvod tepla je velmi obtížný, proto se využívá radiální odtok. (Sýkora a kol., 2007, s. 197-198)

#### 7.1.4 Silikagelové monolity

Monolitické silikagelové kolony nejsou užívány pro separaci makromolekulárních látek, ale pro rychlé dělení malých a středně velkých molekul. Silikagelové monolity při analytických rozměrech nemohou být připraveny v koloně, protože při přímé přípravě dochází ke zmenšení objemu. Tudíž se nejdříve připraví samotný monolit, poté je vnesen do kolony a na závěr je běžně zařazena modifikace povrchu. Běžně jsou dostupné kolony pouze se dvěma průměry. Jedna o průměru 4,6 mm se používá pro separaci a druhá s průměrem 100  $\mu\text{m}$  je vhodná pro kapilární chromatografii. Příprava kapilárních silikagelových monolitů je reprodukovatelnější a snazší než kolony u kolon větších rozměrů. (Sýkora a kol., 2007, s. 197-198)

Silikagelové monolity jsou nestabilní v zásaditém pH, ale mechanicky stabilní. Vyznačují se velkým povrchem, avšak modifikace těchto monolitů patří mezi náročné techniky. (Sýkora a kol., 2007, s. 197-198)

Mezi jednoduché a poměrně stabilní hybridní monolity se zahrnují organické-silikagelové (sulfo/ vinyl dvoufázový hybridní silikagelový monolit). (Zhang et al., 2015, s. 118) Konvenční CZE vyžaduje, aby byl analyt eluován z použitého koncentrátoru pomocí několika nanolitřů pufru, aby došlo k minimálnímu zředění vzorku a k omezení rozšíření píků analytů. Navzdory vzniku rozšířeným píkům, má tento typ monolitů lepší vlastnosti a lze jej využít pro vyšší elučními objemy. (Zhang et al., 2015, s. 119)

## 8 Aplikace metod

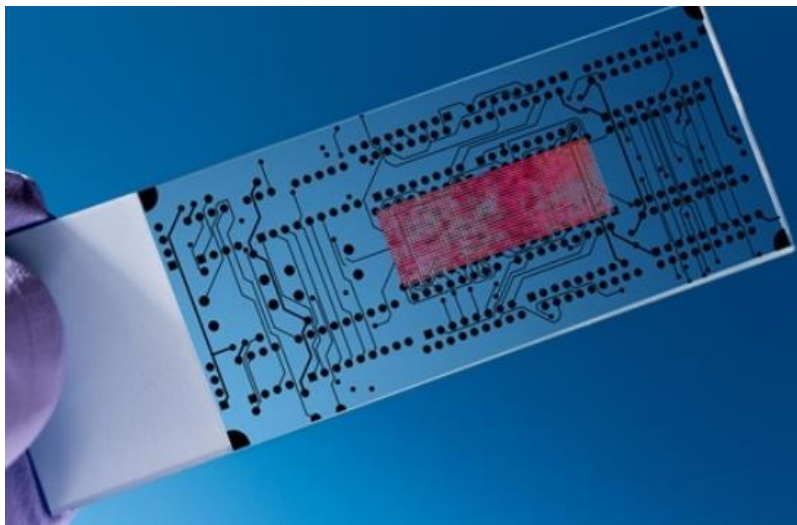
### 8.1 Laserová desorpce

Laserová desorpce (Laser Desorption- Ionization Time of Flight Mass Spectrometry) s přítomností substrátu s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem, která stanoví v submikro litrových objemech stopové a ultra stopové prvky. Jedná se o kvantitativní analýzu kovů v kapalných vzorcích. Analýza kovů je umožněna po kompletní desorpci vzorků o přesně definovaném objemu zpravidla 200 nl, které jsou naneseny na silně absorbující substrát s pomocí pulsů laserového záření (vlnová délka 213 nm) s nízkou hustotou zářivého výkonu laseru ( $10\text{-}100\text{ MW}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Aplikace této metody je úspěšná pro stanovení koncentrace měďnatých iontů, ovlivňující cytotoxicitu disulfiramů vůči buňkám myeloidní leukémie. V kombinaci s MALDI MS se získají informace, nejen o obsahu kovu ale i o hmotnosti proteinu, aniž by došlo k velké spotřebě vzorku. (Jungová a kol., 2010, s. 465)

### 8.2 Lab-on-chip

Oblast nanotechnologie se neustále vyvíjí. Mezi pokroky se řadí vývoj miniaturizovaných zařízení, které se nazývají Lab-on-a-chip. Technologie Lab-on-a-chip se zabývá laboratorními experimenty, které jsou prováděny v nanoměřítku. Na čip o velikosti několika milimetrů až po několik čtverečných centimetrů se spojuje několik laboratorních funkcí. Pomocí čipu při screeningu a při automatizaci se dosáhne vysokého výsledku. Jelikož se experimenty provádí ve velmi malém měřítku, využívají se malé objemy tekutin, tudíž dochází ke snížení nákladů, reagensů a doba odezvy. Technologie umožňuje lepší kontrolu nad koncentracemi vzorků, tím se sníží množství chemického odpadu. V technologii Lab-on-a-chip nalézáme fyzikální i chemické nevýhody, například drsný povrch, kapilární síly chemické interakce mezi materiály. Výzkum se zaměřuje na oblast diagnostik, jak Lab-on-a-chip zakomponovat do diagnostických přístrojů v lékařských ordinacích nebo v pracovištích, kde přístup k laboratorním zařízením je limitovaný nebo vůbec žádný. V medicíně a biologické vědě bylo již prozkoumáno několik aplikací, včetně sekvenování DNA a RNA i použití v studiích krystalických bílkovin. Dále byla studována syntéza radioaktivně značených sloučenin například v pozitronové emisní tomografii. Bylo vyvinuto nové zařízení, které je založeno na technologii Lab-on-a-chip, které v budoucnu sníží náklady na laboratorní testy na onemocnění HIV nebo syfilis. Pro běžné biochemické Lab-

on- a- chip testy je nutné pouze malé množství vzorku, oproti běžným testům, ve kterých je potřeba velké množství vzorku (krve) a velké náklady jsou také na potřebná chemická činidla. Jedná se o automatizované testy, které poskytují přesné a citlivé výsledky. Cílem dalších výzkumů je dosáhnout schopnosti použít při komplexních biochemických analýzách pouze 10 % objemů vzorků při běžných testech. Další možností pro výzkum je se zaměřit na onemocnění centrálního nervového systému, Parkinsonova choroba. Dnešní výzkumníci jsou omezeni na malý objem mozkomíšního moku, který extrahují k tradičním testům. (Cheriyedath, 2016)



**Obrázek 25** Lab- on- chip



## 9 Diagnostika- biomarkery

Biomarkery mají velký význam při monitorování, diagnostice, léčení chorob, hlavně u rakovin, nebo u komplikací v těhotenství. Další metodou k detekci biomarkerů je ELISA. Na podobném principu jsou založeny analýzy v multijamkových destičkách. Výhodou metody je nízká cenová dostupnost, rychlost analýzy, malá spotřeba objemu analytů. (Yang et al., 2015, s. 1-3)

V dnešní době se laboratoře snaží využít vstřikování vzorků o velkých objemech, které se hromadí, přičemž se stále dosahuje vysoké kapacity. Ukládání vzorku probíhá při nízké koncentraci iontového roztoku (kyselina mravenčí s obsahem acetonitrilu) a vysoce separační iontové síly (1 M kyseliny octové). Touto technikou je možné identifikovat velké množství peptidů a proteinů. (Zhang et al, 2015, s. 4572-4575)

Při prvních příznacích onemocnění je důležitá včasná diagnostika onemocnění a následné zahájení terapie a minimální poškození organismu pacienta. Při diagnostice měření látek, typických pro dané procesy, biomarkery, nejčastěji se provádí z krve, moče a mozkomíšního moku. (Šimková a kol., 2010, s. 468)

Při plicním onemocnění se využívá analýza kondenzátu vydechaného vzduchu. Jeho složení je v souladu s ději, které probíhají v plicích a dýchacích cestách. Odběr KVV je pro pacienta nezatěžující a neinvazivní. Naopak dříve používané metody jsou často invazivní (bronchiální biopsie) nebo semiinvazivní. Tyto metody jsou často pro pacienta nepříjemné a zatěžující. Pro seniory a děti může vyšetření vyvolat až stresovou záležitost. Princip analýzy je založen na kvantifikaci látek, které jsou charakteristické pro určité onemocnění, při němž je koncentrace v důsledku patologických procesů v dýchacích cestách a plicích zvýšená. K diagnostice se využívá také molekulární sonda, která je založena na principu navázané monoklonální protilátky proti cysteinylovaným leukotrienům na magnetické nanočástici. Lidé, kteří jsou postiženi onemocněním Asthma bronchiale, mají výrazně zvýšené hodnoty cysteinylovaných leukotrienů, které vznikají v těle z kyseliny arachidonové enzymatickými pochody. Separace z komplexní biologické matrice, tím se myslí například KVV, moč, krevní plazma, a základní myšlenkou je vytvoření specifického komplexu antigen- protilátka na povrchu magnetické nanočástice pomocí magnetického pole. Využívá se k rychlé diagnostice a monitorování průběhu bronchiálního záchvatu nebo i pro sledování následné farmakoterapie. Metoda je charakterizovaná jako vysoko

citlivostní s nízkou chybou stanovení a molekulární sondu je možné vícenásobně použít. (Šimková a kol., 2010, s. 468)

Ze vzorků moče pacientů s karcinomem prostaty lze získat aminokyselinové profily díky amfolitickým vlastnostem aminokyselin, stanovujeme pomocí iontově výměnné chromatografie s detekcí ve viditelném spektru. Separace probíhá na základě odlišného náboje mezi stacionární fází a aminokyselinami (rozdílné izoelektrické body). Analýza je založena na tvorbě komplexů aminokyselin s ninhydrinem, poté dochází ke zkrácení analýzy pro klinicky zajímavé molekuly, sarkosin (N-methylglycin) či taurin (kyselina- 2-aminoethansulfonová), které se používají jako potencionální nádorové markery. Sulfonová kyselina je součást živočišných tkání, součástí fyziologických procesů, například antioxidační ochrana organismu nebo stabilizace buněčných membrán. Aminokyseliny jsou důležité biomolekuly, které mohou indikovat rozmanité patologické stavy (oxidativní stres, zhoubné nádory). (Cernei a kol., 2014, s. 196- 201) *Význam má především stanovení sarkosinu a taurinu v moči pro včasné odhalení možného rozvoje maligních novotvarů prostaty.* (Cernei a kol., 2014, s. 197) Taurin v moči je nalezen u zánětlivých onemocnění střev, chronických onemocnění ledvin. Pro kvantitativní analýzu sarkosinu není potřeba hydrolýzy, protože není obsazen v proteinech. Jako iontoměnič se využívá katex. Separaci aminokyselin je možné provést i na reverzních fázových kolonách, je však nutné provést před kolonovou derivatizací separovaných analytů. Další možností, jak separovat aminokyseliny, je na hydrofobně interakčních kolonách. Mezi výhody iontově- výměnné kapalinové chromatografie s Vis detekcí patří citlivost, přesnost a také široké spektrum detekovaných látek v různých matricích- krev, moč. Neinvazivní analýza sarkosinu v moči, která se využívá pro prebiotické prověření u pacientů s podezřením na přítomnost karcinomu prostaty. Metoda slouží jako screeningová.

Prostatický specifický antigen (PSA) je stanovován v moči enzymometrickou metodou (IEMA). (Cernei a kol., 2014, s. 197)

*Kapilární zónová elektroforéza spojená s hmotnostní spektrometrií poskytuje rychlou a vysoce rozlišenou separaci.* (Zhang et al., 2015, s. 118) U CZE je nalezen špatný koncentrační detekční limit, jedná se o výsledek z důvodu malého objemu injekce, který je potřebný k uchování funkčnosti. Při vstřikování jsou obvyklé objemy v nanolitrech. Ke zvětšení objemu injekce, aniž by došlo k ovlivnění separační funkce, se využívá několik on-line vzorků prekoncentrační techniky, techniky mají založený princip na chromatografii nebo na elektroforéze. Chromatografické techniky generují stacionární fázi na vstupu kapiláry

(Zhang et al., 2015, s. 117-119). Extrakcí na pevné fázi jsou adsorbovány analyty z velkého objemu roztoku vzorku a následně v podstatně menším objemu rozpouštědla jsou analyty eluovány. (Zhang et al., 2015, s. 117-118)

Při použití silného latexového systému SPE, kde jsou vzorky uloženy v kyselém pufru a vymývány pomocí základních pufrů. V kyselém pufru jsou analyzovány vzorky kapilární zónovou elektroforézou. V případě peptidů, které mají záporný náboj, putují ke kladně nabitým elektrodám. Po neutralizaci elučního pufru dojde k nabití analytu kladným nábojem v separačním pufru kyselého charakteru. (Zhang et al., 2015, s. 4572-4577)

## 10 ZÁVĚR

V dnešní době je možné dle vlastností vzorku zvolit metodu z velké nabídky metod, které zajišťují analýzu v širokém spektru vzorků. Moderní doba nám umožňuje zjednodušení některých analýz a některé metody jsou již zautomatizovány, ale i přesto jsou velice rychlé a přesné.

Některé metody jsou náročné na technické vybavení, které je často spojováno s energetickými a ekologickými problémy.

Analýzy materiálů nacházejí se vzorkem uplatnění nejen v oborech jako je zdravotnictví, ale vyskytují se také v zemědělství nebo potravinářství.

I přes všechny dnešní pokroky, budoucnost přinese nové metody, díky kterým budeme získávat kvalitnější výsledky, které přispějí v mnoha oblastech k rozvoji vědy a techniky.

## 11 POUŽITÁ LITERATURA

ADAM, Martin, Ing. *Sborník abstraktů z konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000: pořádané ve dnech 5. a 6. září 2000 v Kongresové hale Univerzity Pardubice Polabiny Stavařov*. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2000. ISBN 80-7194-278-2.

AGILENT TECHNOLOGIES. LC column. *Liquid chromatography* [online]. © 2017 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: <http://www.agilent.com/en-us/products/mass-spectrometry/rapidfire-high-throughput-ms-systems/rapidfire-360/rapidfireoverview>

AGILENT TECHNOLOGIES. Library- brochures. *Agilent discovery services* [online]. © 2012 [cit. 24. 05. 2017].

Dostupné z: <http://www.agilent.com/cs/library/brochures/5991-0200EN.pdf>

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

ATARRI, S., G., A. BAHRAMI, F., G. SHAHNA and M. HEIDARI. Solid-phase microextraction fiber development for sampling and analysis of volatile organohalogen compounds in air. *Journal of environmental health science & engineering* [online]. 2014, **12** [cit. 15. 04. 2016]. Dostupné z:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181725/pdf/40201\\_2014\\_Article\\_123.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181725/pdf/40201_2014_Article_123.pdf)

BIOCOMPARE. RapidIFire 365 High- throughput. *Automated solid phase extraction (SPE) systems* [online]. © 1999- 2017 [cit. 20. 06. 2017]. Dostupné u: <http://www.biocompare.com/9998-Automated-Solid-Phase-Extraction-SPE-Systems/4198327-RapidFire-365-High-throughput-MS-System/>

BRANDŠTETEROVÁ, Eva, KUBALEC, Pavel, BOVANOVÁ, Ľudmila a ČANIOVÁ, Alica. Súčasný stav a trendy v úprave biologických vzoriek pred HPLC analýzou. In: JANDERA, Pavel, VENTURA, editor. *Sborník abstraktů z konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: 5. - 6. září, 2000, s. 13-14. ISBN 80- 7194- 278- 2.

BUKÁČKOVÁ, Monika, Bc., *Stanovení vybraných pesticidů pomocí plynové chromatografie*. Brno, 2012. 82s. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta Chemická. Vedoucí práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc. [cit. 01. 03. 2016]

Dostupné z: <https://dspace.vutbr.cz/bitstream/handle/11012/6393/Bukackova.pdf?sequence=1>

CERNEI, N., Z. HEGER, Š. VESELÝ, O. ZÍTKA, V. ADAM a R. KIZEK, Chromatografická charakterizace aminokyselinových profilů vzorků moči pacientů s karcinomem prostaty. *Klin. Biochem. Metab.*[online]. 2014, **22** (43) [cit. 20.04.2016]. Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2014/2014-4/KBM-4-2014-Kizek-196.pdf>  
CVU STUTTGART. *Quechers* [online]. ©2011 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://quechers.cvuastuttgart.de/index.php?nav1o=3&nav2o=0&nav3o=0>

ČECHOVÁ, Eliška. *Stanovení estrogenů v odpadních vodách*. Brno, 2012. 79s. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká. Vedoucí práce: DOC. RNDr. Zdeněk Šimek, CSc.[cit. 16. 04. 2016] Dostupné z: [http://is.muni.cz/th/270599/prif\\_m/DP-teoreticka\\_cast\\_pouzita\\_literatura.pdf](http://is.muni.cz/th/270599/prif_m/DP-teoreticka_cast_pouzita_literatura.pdf)

ELIAN, A., A. and J. Hackett. Solid- phase extraction and Analysis of THC and Carboxy-THC from Whole Blood Using a Novel Fluorinated Solid- phase extraction sorbent and fast liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal of analytical toxicology* [online]. 2009, **33** [cit. 13. 04. 2016 ] Dostupné z: <http://jat.oxfordjournals.org/content/33/8/461.full.pdf>

DOUGLAS, E. Ranyie. New sample preparation products and accessories for 2017. *LCGC North America* [online]. 2017, **35** (5) [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-sample-preparation-products-and-accessories-2017?pageID=6>.

FRIEDECKÝ, D., K. LEMR, Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2012, 3, 152- 157 [cit. 2016-03-01] Dostupné z: <http://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2012/2012-3/KBM12-3-Friedecky-152.pdf>

GODULA, Michal. Ionizace laserem za přítomnosti matrice za atmosférického tlaku (AP- MALDI)- Nový směr v analýze peptidů a proteinů. *Chemické listy*. 2005, **99**, 930- 936 [cit. 28. 04.2017] Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005\\_12\\_930-936.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_12_930-936.pdf)

GOKCE, E., G. L. ANDREWS, R. A. DEAN and D. C. MUDDIMAN. Increasing proteome coverage with offline RP HPLC coupled to online RP nanoLC-MS. *Journal of Chromatography* [online]. 2011, **879**(0) [cit. 18. 07. 2016]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703961/pdf/nihms480463.pdf>

GORDON, L. J., M. ALLEN, P. ARTURSSON, M. M. HANN, B. J. LEAVENS, A. MATEUS, S. READSHAW, K. VALKO, G. J. WAYNE and A. WEST. Direct Measurement of Intracellular Compound Concentration by RapidFire Mass Spectrometry Offers Insight into Cell Permeability. *Journal of biomolecular screening* [online]. Dostupné z: <http://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/1087057115604141>

HAVLÍČEK, Vladimír. Hmotnostní spektrometrie v protetice. In: HOLČAPEK, Michal, editor. *Sborník přednášek kurzu HPLC/ MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: Kongresová hala Univerzity Pardubice, 2001, s. 121- 123. ISBN 80-7194-390-8

Hernychová, Lenka. Základy hmotnostní spektrometrie. [prezentace]. 2008. 1- 61 s. Universita obrany Hradec Králové, Fakulta vojenského zdravotnictví. Dostupné z: [http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni\\_spektrometrie\\_08.pdf](http://www.pmfhk.cz/Prednasky/Hmotnostni_spektrometrie_08.pdf) [cit. 2016-03-07].

HOLČAPEK, M. a P. JANDERA. Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 1998, **92**, 278- 286 [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998\\_04\\_278-286.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1998_04_278-286.pdf)

CHURÁČEK, Jaroslav. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. 1. vyd. Praha: Academia, 1993. ISBN 80-200-0010-0.

JANDERA, Pavel. Vícerozměrná kapalinová chromatografie. *Chemické listy*. 2010, **104**, 441-442 [cit. 2016- 02- 23] Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_06\\_441-442.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_06_441-442.pdf)

JORDÁNOVÁ, Eva. *Porovnání účinnosti preparativní HPLC a TLC*. Plzeň, 2013. 37 s. Bakalářská práce. Západočeská univerzita v Plzni, Fakulta pedagogická. Vedoucí práce Doc. Mgr. Václav Richter, CSc. [online] 2013 [cit. 2016-03-02] Dostupné z: <https://otik.uk.zcu.cz/bitstream/11025/10574/1/BP%20Eva%20Jordanova%20pdf.pdf>

JUNGOVÁ, P., O. PEŠ, T. VACULOVÍČ, J. NAVRÁTILOVÁ, J. ŠMARDA, V. KANICKÝ a J. PREISLER. Analýza biologických vzorků pomocí laserové desorpce za účasti substrátu ve spojení s hmotnostní spektrometrií s indukčně vázaným plazmatem. *Chemické Listy*. [online] 2010, 104 [cit. 18. 03. 2016]. Dostupné z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_06\\_464-468.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_06_464-468.pdf)

LEHOTAY, Jozef. Stopová a ultrastopová analýza v HPLC. In: JANDERA, Pavel, VENTURA, Karel, editor. *Sborník abstraktů z konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: 5. - 6. září, 2000, s. 9- 10. ISBN 80- 7194-278- 2.

LEMR, Karel. Kompatibilita mobilních fází s HPLC/ API- MS a konstrukce iontového zdroje. In: HOLČAPEK, Michal, editor. *Sborník přednášek kurzu HPLC/ MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice*. Vyd. 1.

Univerzita Pardubice: Kongresová hala Univerzity Pardubice, 2001, s. 100- 105. ISBN 80-7194-390-8

LEMR, K., J. ŠEVČÍK. HPLC- MS a CE- MS v analýze biologicky významných látek. In: JANDERA, Pavel, VENTURA, Karel, editor. *Sborník abstraktů z konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: 5. - 6. září, 2000, s. 27. ISBN 80- 7194- 278- 2.

MACEK, Jan, PTÁČEK, Pavel a KLÍMA, Josef. Rychlé HPLC metody pro analýzu léčiv v biologickém materiálu. In: JANDERA, Pavel, VENTURA, Karel, editor. *Sborník abstraktů z konference Pokroky v chromatografii a elektroforéze 2000*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: 5. - 6. září, 2000, s. 79. ISBN 80- 7194- 278- 2

MALÁROVÁ, Vanda. *Stanovení vitamínů B v sýrech metodou HPLC*. Zlín, 2009. 70 s. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická. Vedoucí práce Ing. Daniela Kramářová, Ph.D. [online] 2009 [cit. 2017- 05-05]. Dostupné z: [http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/10862/mal%C3%A1rov%C3%A1\\_2009\\_bp.pdf?sequence=1](http://digilib.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/10862/mal%C3%A1rov%C3%A1_2009_bp.pdf?sequence=1)

MAYADUNNA, E. and Z. EL RASSI. Facile preparation of octadecyl monolith with incorporated carbon nanotubes and neutral monolith with coated carbon nanotubes stationary phases for HPLC of small and large molecules by hydrophobic and  $\pi$ - $\pi$  interaction. *Talanta* [online]. 2014, 129 [cit. 18. 07. 2016].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4134917/pdf/nihms608024.pdf>

MENDELOVA UNIVERZITA. Elektronická knihovna. *Metody analýzy potravin* [online]. Brno: ©2013 [cit. 26. 02. 2016].

Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?opora=5352>

MOEIN, Mohammad Mahdi. Solid phase microextraction and related technique for drugs in biological samples. *Journal of Analytical methods in chemistry*. [online] 2014, 24 [cit. 13. 04. 2016]

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943203/pdf/JAMC2014-921350.pdf>

OMANOVIC-MIKLICANIN, E., VALZACCHI, S., SIMONEAU, C., GILLILAND, D., ROSSI, F., Solid-phase microextraction/ gas chromatography-mass spektrometry method optimization for characterization of surface adsorption forces of nanoparticles. *Anal Bioanal Chem* [online]. 2014, 406 [cit. 16. 04. 2016]. Dostupné z: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4182651/pdf/216\\_2014\\_Article\\_8078.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4182651/pdf/216_2014_Article_8078.pdf)



PLÍŠEK, Jiří, Mgr., *Využití separačních metod klinickém výzkumu*. Hradec Králové, 2015.251s. Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Fakulta farmaceutická v Hradci Králové. Vedoucí práce prof. RNDr. Petr Solich, doc. RNDr. Dagmar Solichová, PhD. [cit. 20. 04. 2016]. Dostupné z: <https://is.cuni.cz/webapps/zzp/download/140048053>

RESEARCH INSTRUMENT. Waters- science ofwhat'spossible. *LiquidChromatography- Sample Preparation Products & Other Consumables* [online] [cit. 2016-02-24]. Dostupné z: <http://www.ri.com.my/#!/lc-30-38---sample-prep/c1fk1>

SOBOTNÍKOVÁ, J., and Z. BOSÁKOVÁ. Historie, současnost a perspektivy analytických separačních metod na katedře analytické chemie přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Chemické Listy*[online].2010, **104** [cit.02.07.2016]. Dostupné z: [http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_12\\_1226-1231.pdf](http://w.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_12_1226-1231.pdf)

SÝKORA, D., E. TESAŘOVÁ, V. VOSMANSKÁ a M. ZVOLÁNKOVÁ. Moderní stacionární fáze pro RP-HPLC. *Chemické Listy* [online]. 2007, **101** [cit. 28. 06. 2016] Dostupné z: [http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2007\\_03\\_190-199.pdf](http://ww.chemicke-listy.cz/docs/full/2007_03_190-199.pdf)

UBIK, Karel. Úvod do organické hmotové spektrometrie. In: HOLČAPEK, Michal, editor. *Sborník přednášek kurzu HPLC/ MS pořádaného Spektroskopickou společností Jana Marka Marci a Univerzitou Pardubice*. Vyd. 1. Univerzita Pardubice: Kongresová hala Univerzity Pardubice, 2001, s. 6- 26 . ISBN 80-7194-390-8

VIJAYARAJ, S., N. REDDY KUMARI. Sample preparation in bio analytical methods- A review. *Asian Journal of Pharmaceutical Science & Technology* [online]. 2013, **1**, 1-7 [cit. 23. 03. 2017] Dostupný z: [http://www.ajpst.com/File\\_Folder/1-7.pdf](http://www.ajpst.com/File_Folder/1-7.pdf) .

VOLNÝ, M. LEMR, K. HAJDÚCH, M. VIDOVÁ, V. ŠULC, M. KUZMA, K. BENADA, O. HAVLÍČEK, V. Současné trendy hmotnostní spektrometrie. *Chemické listy*. 2010, **104**, 441-442 [cit. 2016- 02- 23] Dostupný z: [http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010\\_06\\_441-442.pdf](http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2010_06_441-442.pdf)

WOJTOWICZ, P., H. JANEČKOVÁ, D. FRIEDECKÝ a T. ADAM. Techniky metabolomiky v biomedicíně. *Chemické listy*. 2013, **107**, 3-11. Dostupné z: [http://ww.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2013\\_01\\_3-11.pdf](http://ww.w.chemicke-listy.cz/docs/full/2013_01_3-11.pdf)

YANG, R., J. V. PAGADUAN, M. YU and A. T. WOOLLEY. On chip preconcentration and fluorescence labeling of model proteins using monolithic columns: device fabrication, optimization, and automation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2015, **407** (3), 737-747 [cit. 18. 07. 2016].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4313764/pdf/nihms658770.pdf>

ZHANG, Z., L. SUN, X. YAN and N. J. DOVICH. Integrated strong cation-exchange hybrid monolith coupled with capillary zone electrophoresis and simultaneous dynamic pH junction for large-volume proteomic analysis by mass spectrometry. *Talanta* [online]. 2015, **138**, 117-122 [cit. 27. 06. 2016].

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4394190/pdf/nihms669472.pdf>

ZHANG, Z., X. YAN, L. SUN, G. ZHU and N. J. DOVICH. A detachable strong cation exchange monolith, integrated with capillary zone electrophoresis and coupled with pH gradient elution, produce improved sensitivity and numbers of peptide identifications during bottom-up analysis of complex proteomes. *Analytical Chemistry* [online]. 2015, **87**(8) [cit. 18. 07. 2016]

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4406858/pdf/nihms677503.pdf>

## 12 POUŽITÉ ILUSTRACE

### **Obrázek 26** Plynový chromatograf

COUFAL, P. *HIGH PERFORMACE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC* [online]. 2. 3. 1998 [cit. 2017-06-03]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>

### **Obrázek 27** Kapalinový chromatograf

COUFAL, P. *HIGH PERFORMACE LIQUID CHROMATOGRAPHY, HPLC* [online]. 2. 3. 1998 [cit. 2017-06-03]. Dostupné z: <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html>

### **Obrázek 28** Schéma hmotnostního spektrometru

VÁVROVÁ, J. *Hmotnostní spektrometrie* [online]. [cit. 2017-06-03]. Dostupné z: <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD/hypertext/JVATE.htm>

### **Obrázek 29** Princip MALDI

NATIONAL MAGNETIC FIELD LABORATORY. Matrix- assisted laser desorption ionization (MALDI). *National magnetic field laboratory* [online]. ©2014- 2017 [vid. 2017-06-15]. Dostupné z: <https://nationalmaglab.org/user-facilities/icr/techniques/maldi>

### **Obrázek 30** Schéma MALDI- TOF

STEINKE, Dirk. MALDI- TOF-MS. In: DNA barcoding blog [online]. August 14, 2013 [cit. 2017-06-15]. Dostupné z: <http://dna-barcoding.blogspot.cz/2013/08/maldi-tof-ms.html>

### **Obrázek 31** Spojení HPLC/MS

ASCA. Services. *ASCA GmbH* [online]. Berlín: ASCA, [vid. 2017-06-15]. Dostupné z: <https://asca-berlin.de/en/services/>

### **Obrázek 32** Průběh SPE

CHROMATOGRAPHIC SPECIALTIES INC. *Solid phase Extraction (SPE)* [online]. ©2017 [cit. 15. 06. 2017]. Dostupné z: <https://www.chromspec.com/content/spe>

### **Obrázek 33** Systém RapidFire/MS

DRUG DISCOVERY & DEVELOPMENT. *The next big step for high- throughput ADME* [online]. 2012, 04. 12. 2012 [cit. 26. 06. 2017]. Dostupné z: <https://www.dddmag.com/article/2012/04/next-big-step-high-throughput-adme>

### **Obrázek 34** THC

DEPOSIT PHOTOS. *Molekulární struktura tetrahydrocannabinolu*. [online]. © 2009- 2017 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: <https://cz.depositphotos.com/139473260/stock-photo-molecular-structure-of-tetrahydrocannabinol.html>

### **Obrázek 35** Dvoufázové zařízení SBSE

BICCHI, Carlo, LIBERTO, Erica, CORDERO, Chiara, SGORBINI, Barbara and RUBIOLO, Patrizia. Stir bar sorptive extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): Over view. In: *Chromatography online. com* [online]. 01. 05. 2009 [cit. 18. 06. 2017]. Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/stir-bar-sorptive-extraction-sbse-and-headspace-sorptive-extraction-hsse-overview>

**Obrázek 36** Přidání acetonitrilu

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

**Obrázek 37** Centrifugace

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

**Obrázek 38** Vialky pro GC nebo HPLC analýzu

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

**Obrázek 39** Schéma SPME chráněné membránou, používáno Pawliszyn a Musteata CARASEK, E. and J. Merib. Membrane- based microextraction techniques in analytical chemistry: A review. *Analytica chimica acta* [online]. 20. 02. 2015 [cit. 18. 06. 2017] Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/272523809\\_fig3\\_Fig-3-Scheme-of-the-membrane-protected-SPME-used-by-Musteata-and-Pawliszyn-Reproduced](https://www.researchgate.net/figure/272523809_fig3_Fig-3-Scheme-of-the-membrane-protected-SPME-used-by-Musteata-and-Pawliszyn-Reproduced)

**Obrázek 40** Schématické znázornění HS- SPME

FARHADI, K., R. TAHMASEBI, P. BIPARVA and R. MALEKI. In vitro study of the binding between chlorpyrifos and sex hormones using headspace solid- phase microextraction combined with- performance liquid chromatography: A new aspect of pesticides and breast cancer risk. In: Research gate. [online]. 02. 2015 [cit. 18. 06. 2017]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/272185582\\_fig2\\_Figure-2-Schematic-representation-of-the-HS-SPME-and-desorption-processes-with-the-new](https://www.researchgate.net/figure/272185582_fig2_Figure-2-Schematic-representation-of-the-HS-SPME-and-desorption-processes-with-the-new)

**Obrázek 41** SPME stříkačky- složení

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

**Obrázek 42** SPME vlákna

AGILENT TECHNOLOGIES. Solid phase microextraction (spme fiber). *Sample preparation methods*. [online]. © 2017 [cit. 18. 06. 2017].

Dostupné z: [http://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-microextraction-\(spme\)/spme-fibers#promotions](http://www.agilent.com/en/products/sample-preparation/sample-preparation-methods/solid-phase-microextraction-(spme)/spme-fibers#promotions)

**Obrázek 18** SPME vlákna

CHROMSERVIS. *SPME fiber* [online]. © 2016 18. 06. 2016].

Dostupné z: <https://www.chromservis.eu/p/pdms-spme-fiber-thickness-7-m-length-10mm-green-ea?lang=CZ>

**Obrázek 43** Přejechod sol-gel

*Surface technology* [online]. [cit. 20. 06. 2017].

Dostupné z: [http://www.uk-finishing.org.uk/N-COAT70/sol\\_gel.htm](http://www.uk-finishing.org.uk/N-COAT70/sol_gel.htm)

**Obrázek 44** Princip DLLME

WEN, Yingying, LI, Jinhua, ZHANG, Weiwei and CHEN, Lingxin. Dispersive liquid- liquid microextraction with capillary electrophoresis for simultaneous determinativ of sulfonamides with the aid of experimental design. In: *Researchgate.net*, 08. 2011 [cit. 19. 06. 2017].

Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/51524707\\_fig6\\_Figure-1-Scheme-of-the-DLLME-procedure](https://www.researchgate.net/figure/51524707_fig6_Figure-1-Scheme-of-the-DLLME-procedure)

**Obrázek 45** Schéma uspořádání HF-LPME

CARASEK, E. and J. Merib. Membrane- based microextraction techniques in analytical chemismy: A review. *Analytica chimica acta* [online]. 20. 02. 2015 [cit. 18. 06. 2017].

Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/272523809\\_fig6\\_Fig-6-Diagram-of-experimental-set-up-used-in-the-fi-rst-study-involving-HF-LPME](https://www.researchgate.net/figure/272523809_fig6_Fig-6-Diagram-of-experimental-set-up-used-in-the-fi-rst-study-involving-HF-LPME)

**Obrázek 46** Provedení LLE v dělicí nálevce

AGILENT TECHNOLOGIES. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography* [online]. 2013 [cit. 24. 05. 2017]. Dostupné z: [https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN\\_SPHB.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/5991-3326EN_SPHB.pdf)

**Obrázek 47** HPLC sorbenty

SORBENT. *HPLC* [online]. © 2017 [cit. 28. 06. 2017].

Dostupné z: <http://www.sorbent.se/produkt/hplc>

**Obrázek 48** Příprava polymerních monolytických kolon

HPLC. *Monolithic columns* [online]. [cit. 28. 06. 2017].

Dostupné z: [http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic\\_columns.htm](http://www.hplc.cz/Teorie/monolithic_columns.htm)

### **Obrázek 49** Lab- on- chip

NEWS MEDICAL. Life science. *What is Lab on a chip* [online]. Poslední změna 25. 7. 2016 [cit. 28. 06. 2017].

Dostupné z: <https://sites.google.com/site/novaiso690/schema-a-priklady/elektronick-zdroje>

### **Tabulka 1** Sorbenty k přípravě vzorku

DOUGLAS, E. Ranyie. New sample preparation products and accessories for 2017. LCGC North America [online]. 2017, 35 (5) [cit. 24. 05. 2017].

Dostupné z: <http://www.chromatographyonline.com/new-sample-preparation-products-and-accessories-2017?pageID=4>