

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**Disperzní kapalinová mikroextrakce
propofolu v SIA systému se dvěma
ventily a fluorescenční detekcí**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Warunya Boonjob, Ph.D.

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

Hradec Králové 2014

Zuzana Rojková-Kovačiková

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

V Hradci Králové:

Ráda bych poděkovala především vedoucí mé diplomové práce Warunyi Boonjob, Ph.D., konzultantce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. a Mgr. Ivaně Šrámkové za jejich cenné rady, trpělivost a vstřícnost. Také bych chtěla poděkovat rodičům za jejich podporu při studiu.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Zuzana Rojková-Kovačiková

Školitel: Warunya Boonjob, Ph.D.

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

Název diplomové práce: Disperzní kapalinová mikroextrakce propofolu v SIA systému se dvěma ventily a fluorescenční detekcí

Tato diplomová práce se zabývá stanovením propofolu pomocí automatizace disperzní kapalinové mikroextrakce (DLLME) v SIA systému s fluorescenční detekcí. Za extrakční rozpouštědlo byl zvolen amylacetát, jako disperzní činidlo byl použit acetonitril. Byly optimalizovány parametry měření v SIA systému. Lineární závislost intenzity fluorescence na koncentraci propofolu s korelačním koeficientem 0,9945 byla nalezena v koncentračním rozmezí 8 – 64 $\mu\text{g/ml}$. Byl vypočten limit detekce ($\text{LOD} = 0,83 \mu\text{g/ml}$) a limit kvantifikace ($\text{LOQ} = 7,25 \mu\text{g/ml}$). Opakovatelnost byla ověřena pro koncentrace 16 a 64 $\mu\text{g/ml}$, hodnoty relativních směrodatných odchylek (RSD) byly 1,54% a 1,52%. Čas analýzy byl 152 s v případě jednoho nástřiku vzorku.

ABSTRACT

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Zuzana Rojková-Kovačiková

Supervisor: Warunya Boonjob, Ph.D

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

Title of diploma thesis: Dispersive liquid-phase microextraction of propofol using Dual valve SIA system with fluorimetric detection

This thesis deals with determination of propofol using automated dispersive liquid – liquid microextraction (DLLME) in SIA system with fluorimetric detection. Amyl acetate was selected as the extraction solvent; acetonitrile was used as the disperser solvent. Measurement parameters in SIA system were optimized. The calibration curve was linear in the range of propofol concentration 8 – 64 $\mu\text{g/ml}$ with the correlation coefficient 0.9945. The limit of detection (LOD = 0.83 $\mu\text{g/ml}$) and the limit of quantification (LOQ = 7.25 $\mu\text{g/ml}$) were calculated. Repeatability for concentrations 16 and 64 $\mu\text{g/ml}$ was proved; the values of the relative standard deviations (RSDs) were 1.54% and 1.52%. The analysis time was 152 s in case of one sample injection.

Obsah

| | |
|--|----|
| Obsah | 6 |
| Seznam zkratek | 9 |
| 1. Úvod..... | 11 |
| 2. Cíl a popis zadání práce | 12 |
| 3. Teoretická část..... | 13 |
| 3.1. Sekvenční injekční analýza..... | 13 |
| 3.1.1. Uspořádání systému a princip sekvenční injekční analýzy | 13 |
| 3.1.2. Výhody a využití SIA ve farmacii..... | 14 |
| 3.1.3. DV-SIA..... | 15 |
| 3.1.4. Lab-on-valve formát..... | 15 |
| 3.1.5. Sekvenční injekční chromatografie | 16 |
| 3.2. Kapalinová mikroextrakce | 17 |
| 3.2.1. Mikroextrakce jednou kapkou | 18 |
| 3.2.2. Mikroextrakce využívající duté vlákno | 19 |
| 3.2.3. Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému | 20 |
| 3.2.3.1. Přednosti DLLME | 21 |
| 3.2.3.2. Nedostatky DLLME a možnosti jejich řešení | 21 |
| 3.2.3.3. Automatizace DLLME v SIA systému | 22 |
| 3.4. Fluorescenční detekce | 23 |
| 3.4.1. Faktory ovlivňující fluorescenci..... | 25 |
| 3.4.2. Instrumentace | 25 |
| 3.4.3. Analytické využití | 26 |
| 3.5. Propofol | 27 |
| 3.5.1. Vlastnosti | 27 |

| | |
|---|----|
| 3.5.2. Stanovení propofolu..... | 28 |
| 3.5.2.1. Lékopisná metoda | 28 |
| 3.5.2.2. Stanovení propofolu v biologickém materiálu | 28 |
| 3.5.2.3. Stanovení propofolu v léčivých přípravcích | 29 |
| 4. Experimentální část..... | 30 |
| 4.1. Materiál | 30 |
| 4.1.1. Chemikálie | 30 |
| 4.1.2. Přístroje a software | 31 |
| 4.2. Pracovní postup | 31 |
| 4.2.1. Příprava roztoků | 31 |
| 4.2.1.1. Zásobní roztoky | 31 |
| 4.2.1.2. Kalibrační roztoky | 32 |
| 4.2.2. Výběr extrakčního rozpouštědla | 32 |
| 4.2.3. Výběr disperzního činidla..... | 33 |
| 4.2.4. Výběr extrakční jednotky | 33 |
| 4.2.5. Optimalizace SIA systému | 33 |
| 4.2.5.1. Optimalizace způsobu mísení | 35 |
| 4.2.5.2. Optimalizace rychlosti průtoku detektorem..... | 35 |
| 4.2.5.3. Optimalizace objemu extrakční směsi | 36 |
| 4.2.5.4. Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru | 36 |
| 4.2.5.5. Studium možnosti zvýšení extrakční účinnosti úpravou pH..... | 36 |
| 4.2.5.6. Optimalizace dalších parametrů a výsledný program | 36 |
| 4.2.5.7. Kalibrační závislost..... | 36 |
| 4.2.5.8. Opakovatelnost | 37 |
| 5. Výsledky..... | 38 |
| 5.1. Výběr extrakčního rozpouštědla..... | 38 |
| 5.2. Výběr disperzního činidla..... | 38 |

| | |
|--|----|
| 5.3. Výběr extrakční jednotky..... | 38 |
| 5.4. Optimalizace SIA systému | 39 |
| 5.4.1. Optimalizace způsobu mísení..... | 39 |
| 5.4.2. Optimalizace rychlosti průtoku detektorem | 41 |
| 5.4.3. Optimalizace objemu extrakční směsi | 42 |
| 5.4.4. Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru | 43 |
| 5.4.5. Studium možnosti zvýšení extrakční účinnosti úpravou pH | 45 |
| 5.4.6. Optimalizace dalších parametrů a výsledný program | 46 |
| 5.4.7. Kalibrační závislost..... | 52 |
| 5.4.8. Opakovatelnost..... | 55 |
| 6. Souhrn | 57 |
| 7. Závěr | 59 |
| 8. Seznam literatury | 60 |
| Seznam obrázků | 65 |
| Seznam tabulek | 66 |

Seznam zkratek

| | |
|----------------|--|
| BI | bead injection |
| CRL | chemická referenční látka |
| DI-SDME | mikroextrakce přímo ponořenou kapkou (direct immersion single-drop microextraction) |
| DLLME | mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (dispersive liquid – liquid microextraction) |
| DV-SIA | systém sekvenční injekční analýzy se dvěma ventily (dual-valve sequential injection analysis) |
| ETAAS | elektrotermální atomová absorpční spektrometrie (electrothermal atomic absorption spectrometry) |
| FAAS | plamenová atomová absorpční spektrometrie (flame atomic absorption spectrometry) |
| FIA | průtoková injekční analýza (flow injection analysis) |
| FU | fluorescenční jednotka (fluorescence unit) |
| GABA | kyselina γ -aminomáselná |
| GC – MS | plynová chromatografie kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography – mass spectrometry) |
| HF-LPME | mikroextrakce využívající duté vlákno (hollow fibre liquid phase microextraction) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography) |
| HS-SDME | mikroextrakce jednou kapkou využívající headspace (headspace single-drop microextraction) |

| | |
|----------------|--|
| HS-SPME | mikroextrakce tuhou fází využívající headspace (headspace solid phase microextraction) |
| LLE | extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction) |
| LOD | limit detekce (limit of detection) |
| LOQ | limit kvantifikace (limit of quantification) |
| LOV | lab-on-valve uspořádání |
| LPME | kapalinová mikroextrakce (liquid phase microextraction) |
| MS | hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry) |
| R | činidlo |
| RSD | relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation) |
| SD | směrodatná odchylka (standard deviation) |
| SDME | mikroextrakce jednou kapkou (single-drop microextraction) |
| SIA | sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis) |
| SIC | sekvenční injekční chromatografie (sequential injection chromatography) |
| SL | slepý roztok |
| VZ | vzorek |

1. Úvod

Sekvenční injekční analýza je jednou z neseparačních průtokových metod s mnoha výhodnými vlastnostmi, jako je spolehlivost, jednoduchost a rychlost analýzy.

Disperzní kapalinová mikroextrakce je mikroextrakční technika, mezi jejíž hlavní přednosti patří krátká doba extrakce, jednoduchost provedení, nízká spotřeba rozpouštědel a z ní plynoucí nízké množství odpadu.

V této práci bylo spojení obou technik využito k fluorescenčnímu stanovení propofolu, což je látka používaná především jako celkové nitrožilní anestetikum.

2. Cíl a popis zadání práce

Cílem této diplomové práce byla optimalizace metody pro stanovení propofolu pomocí disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny automatizované v systému sekvenční injekční analýzy s fluorescenční detekcí. Úkolem bylo vybrat extrakční rozpouštědlo, disperzní činidlo a extrakční jednotku, optimalizovat parametry měření v SIA systému, jako je způsob mísení vzorku a extrakční směsi, objem extrakční směsi a objem dávkovaný do detektoru a na závěr proměřit kalibrační závislost, určit detekční a kvantifikační limit a ověřit opakovatelnost.

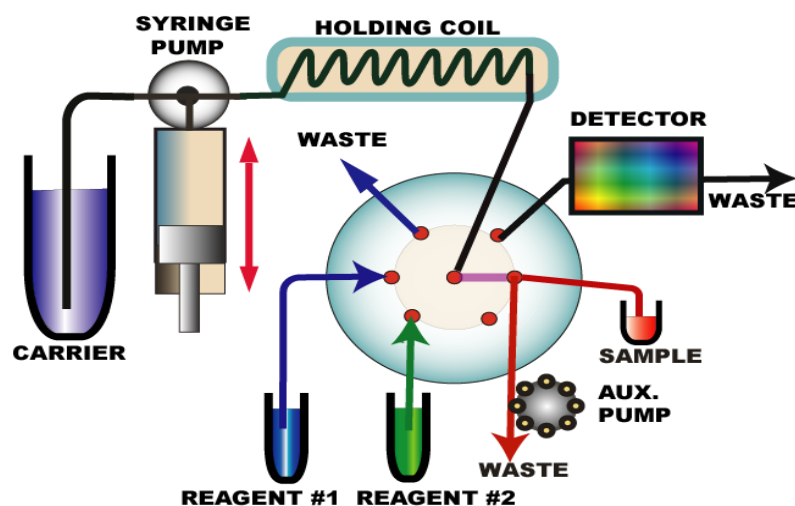
3. Teoretická část

3.1. Sekvenční injekční analýza

3.1.1. Uspořádání systému a princip sekvenční injekční analýzy

Sekvenční injekční analýza (SIA) patří stejně jako průtoková injekční analýza (FIA) mezi průtokové neseparační metody. Principy, na nichž SIA stojí, jsou podobné jako u FIA, avšak SIA na rozdíl od FIA využívá oddělených měřících cyklů a změn přímého a zpětného toku. Systém SIA tvoří (Obrázek 1):

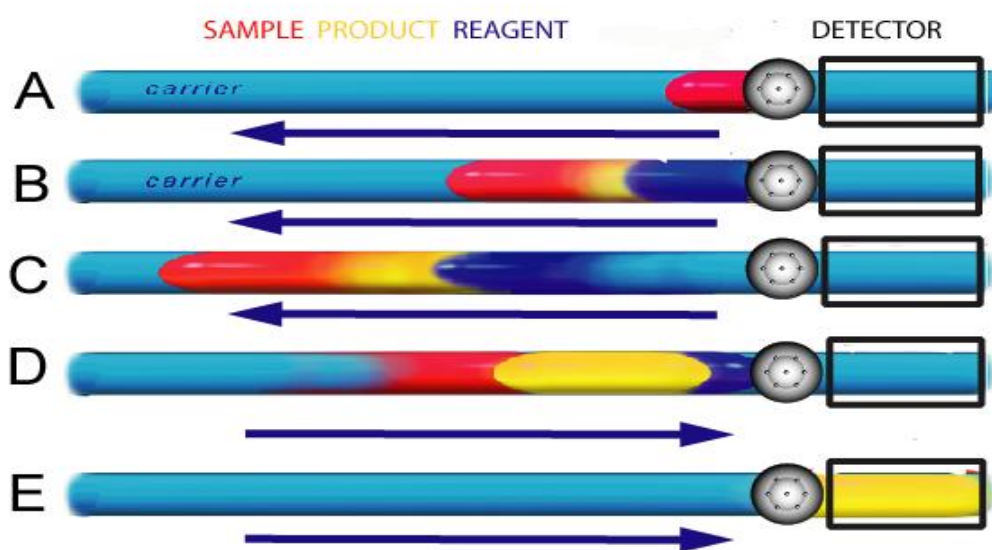
- Čerpadlo
- Vícecestný selekční ventil
- Mísící cívka
- Detektor
- Počítač
- Spojovací materiál



Obrázek 1: Schéma systému SIA [1]

Carrier – nosný proud, syringe pump – čerpadlo, holding coil – mísící cívka, sample – vzorek, reagent – činidlo, waste – odpad, aux. pump – pomocné čerpadlo, detector – detektor

Nejdříve dochází k aspiraci nosného proudu do obousměrného pístového čerpadla s nastavitelnou rychlostí pohybu. Vzorek a činidla jsou poté odděleně čerpány ze svých zásobníků přes porty vícecestného selekčního ventilu do mísící cívky. Následně dojde ke změně toku, což vede k promíchání zón vzorku a činidel za vzniku zóny produktu, jehož vlastnosti jsou pak měřeny detektorem. Podle druhu použité analytické reakce se používají spektrofotometry, fluorimetry či např. elektrochemické detektory. Nezbytnou součástí SIA systému je počítač se speciálním softwarem, který řídí činnost čerpadla i ventilu a zpracovává výsledky měření. SIA systém se od FIA systému liší především přítomností vícecestného selekčního ventilu, jehož porty propojují všechny součásti systému nejčastěji prostřednictvím teflonových hadiček s průměrem od 0,5 mm do 0,8 mm [2, 3]. Princip SIA shrnuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Změna směru toku při SIA [1]

Carrier – nosný proud, sample – vzorek, product – produkt, reagent – činidlo, detector – detektor

3.1.2. Výhody a využití SIA ve farmacii

Pravděpodobně největší výhodou je možnost měnit nastavení parametrů při provádění různých analýz pomocí počítače bez nutnosti přestavovat systém

fyzicky. Další předností je velmi nízká spotřeba vzorku a činidel a minimální tvorba odpadu, protože stačí dávkovat malé objemy vzorku a činidel selekčním ventilem a tok není na rozdíl od FIA kontinuální. SIA je metoda rychlá, spolehlivá, jednoduchá a plně automatizovaná. Vzhledem k těmto vlastnostem nalézá široké uplatnění v praxi, pomocí této techniky se stanovují organické látky i anorganické ionty. Ve farmacii se SIA používá ke stanovení mnoha léčiv, kontrole jejich jakosti a účinnosti, při provádění stabilitních studií či zkouškách disoluce [2, 3].

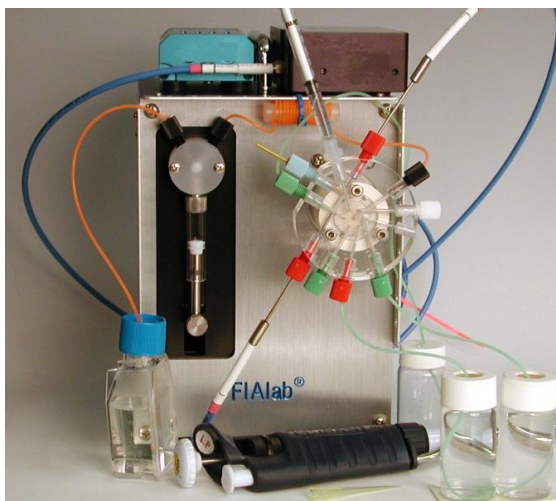
3.1.3. DV-SIA

Univerzálnost SIA techniky umožňuje do systému zařadit i jiné součásti, např. extrakční jednotku, další čerpadlo a ventil. Uspořádání se dvěma ventily, tzv. dual-valve SIA (DV-SIA), je výhodné při automatizaci extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), protože je pak možné systém rozdělit na více samostatných částí, přičemž v jedné části dochází k aspiraci pouze organické fáze, což řeší některé problémy během detekce spojené s rozdílnou afinitou organické a vodné fáze k teflonovým hadičkám. Vzniklý systém je jednoduchý, snadno ovladatelný a univerzální, pokud jde o analyzované vzorky a použitá rozpouštědla, navíc je možné jej sestavit z komerčně dostupných součástí [4]. Typický DV-SIA systém se skládá ze tří základních jednotek: mísící, extrakční a detekční. Mísící jednotka slouží k manipulaci pouze s vodnou fází (aspiraci a mísení vzorku a činidel), v detekční jednotce dochází k aspiraci pouze organické fáze jakožto nosného proudu a extrahovaného analytu z extrakční jednotky, který je následně detekován. Obě fáze jsou smíseny v extrakční jednotce, jejíž velikost a tvar je možné přizpůsobit dané aplikaci [5].

3.1.4. Lab-on-valve formát

Jedním z trendů, který ještě rozšířil využití SIA v laboratořích, byla miniaturizace systému SIA a vytvoření tzv. μ SI lab-on-valve (LOV) systému. Cílem bylo, aby se ještě zvýšila rychlost analýzy a aby docházelo ještě k menším spotřebám

vzorku a činidel. To bylo umožněno integrací detekční cely a dalších součástí do pevné struktury připevněné na selekčním ventilu. Vzniklý LOV systém je díky své malé velikosti přenosný a uživatel může probíhající operace snadno pozorovat (Obrázek 3).

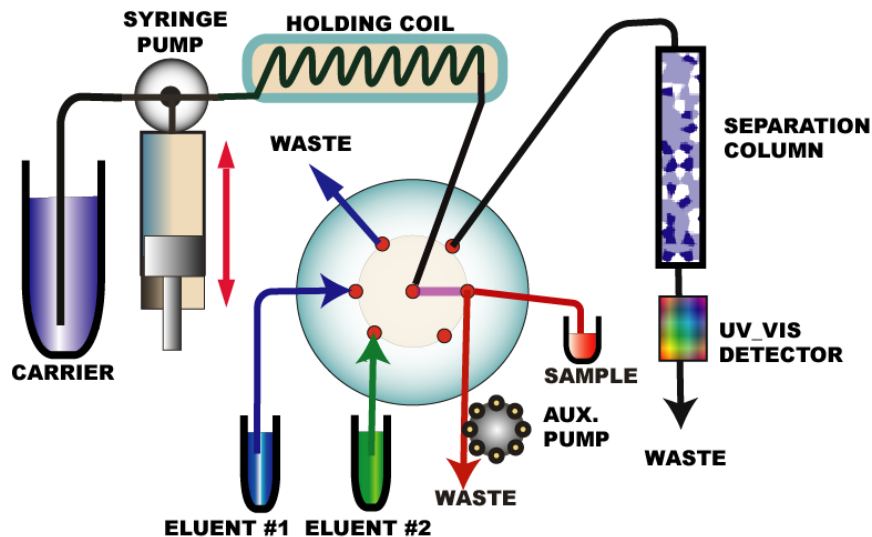


Obrázek 3: SIA – LOV [1]

Spotřeba vzorku a činidel se pohybuje mezi 5 a 25 μl během jedné analýzy a spotřeba nosného proudu mezi 100 a 250 μl . Detekce bývá nejčastěji spektrofotometrická a fluorescenční, případně může být chemiluminiscenční či třeba konduktometrická. LOV formát využívá i technika Bead injection (BI), jejíž hlavní předností je zvýšená citlivost měření díky nahromadění analytu na povrchu mikročástic, přičemž nezadržená matrice vzorku je snadno odstraněna [1].

3.1.5. Sekvenční injekční chromatografie

Další technikou je sekvenční injekční chromatografie (SIC). Mezi vícecestný selekční ventil a detektor SIA systému je zapojena separační kolona, což umožňuje jednoduchou separaci a kvantifikaci některých sloučenin (Obrázek 4). Tato technika může být alternativou k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) v případech, kdy je potřeba rychle separovat poměrně nízký počet složek [1, 6].



Obrázek 4: Schéma systému SIC [1]

Carrier – nosný proud, syringe pump – čerpadlo, holding coil – mísící cívka, sample – vzorek, reagent – činidlo, waste – odpad, aux. pump – pomocné čerpadlo, separation column – separační kolona, UV_VIS detector – UV/VIS detektor

3.2. Kapalinová mikroextrakce

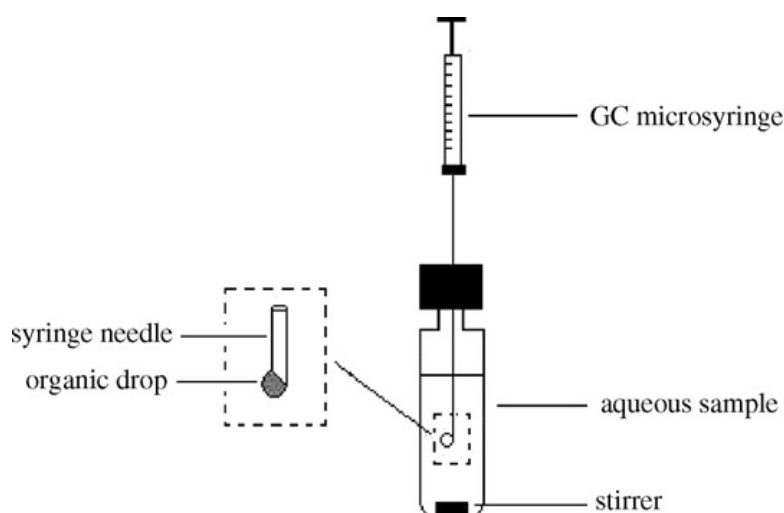
Mezi nejčastěji používané analytické metody sloužící k úpravě vzorku se řadí extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE).

Miniaturizace této metody vedla k podstatnému snížení spotřeby rozpouštědel, tím pádem i k redukci tvorby odpadu [7]. Spotřeba rozpouštědel při LLE se pohybuje v řádech desítek až stovek mililitrů, zatímco v případě miniaturizované LLE, kapalinové mikroextrakce (LPME), spotřebované objemy dosahují jen několika málo mililitrů. K mikroextrakčním technikám z kapaliny do kapaliny patří např. mikroextrakce jednou kapkou (SDME), mikroextrakce využívající duté vlákno (HF-LPME) a mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (DLLME) [8].

3.2.1. Mikroextrakce jednou kapkou

Existuje několik způsobů, jak provádět tuto metodu, z nichž dva jsou pravděpodobně nejvíc používány: mikroextrakce přímo ponořenou kapkou (DI-SDME) a mikroextrakce jednou kapkou využívající tzv. headspace (HS-SDME) [9].

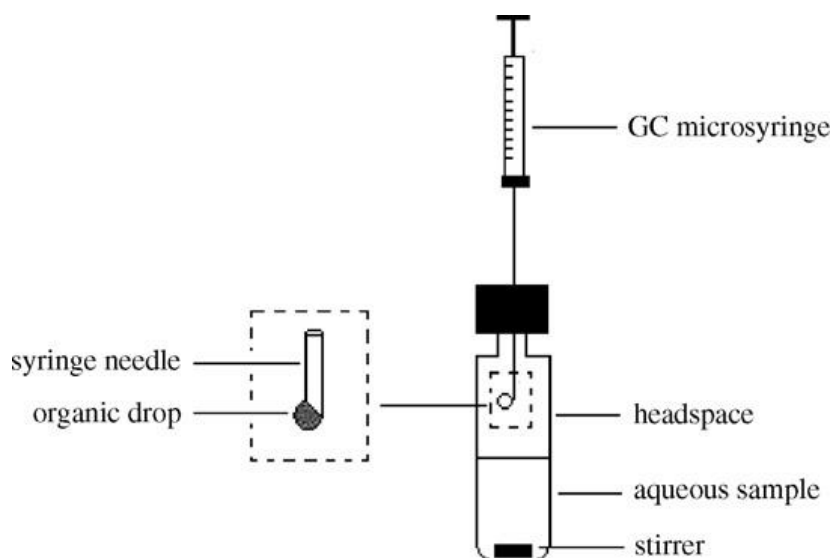
DI-SDME je založena na ponoření kapky s vodou nemísitelného organického rozpouštědla do vodného roztoku vzorku, jenž je míchán magnetickým míchadlem. Tato kapka o objemu asi 1 až 10 μl je zavěšena na jehle mikrostříkačky a po extrakci vzorku do organického rozpouštědla dojde k opětovnému nasátí kapky do stříkačky a vstříknutí do detektoru [10]. Princip shrnuje Obrázek 5.



Obrázek 5: Princip DI-SDME [11]

GC microsyringe – mikrostříkačka, aqueous sample – vodný roztok vzorku, stirrer – míchadlo, syringe needle – jehla, organic drop – kapka organické fáze

HS-SDME je založena na podobném principu, oproti DI-SDME však umožňuje extrakci těkavých látek do mikrokapky, která je zavěšena nad vzorkem v uzavřeném prostoru (Obrázek 6) [12].

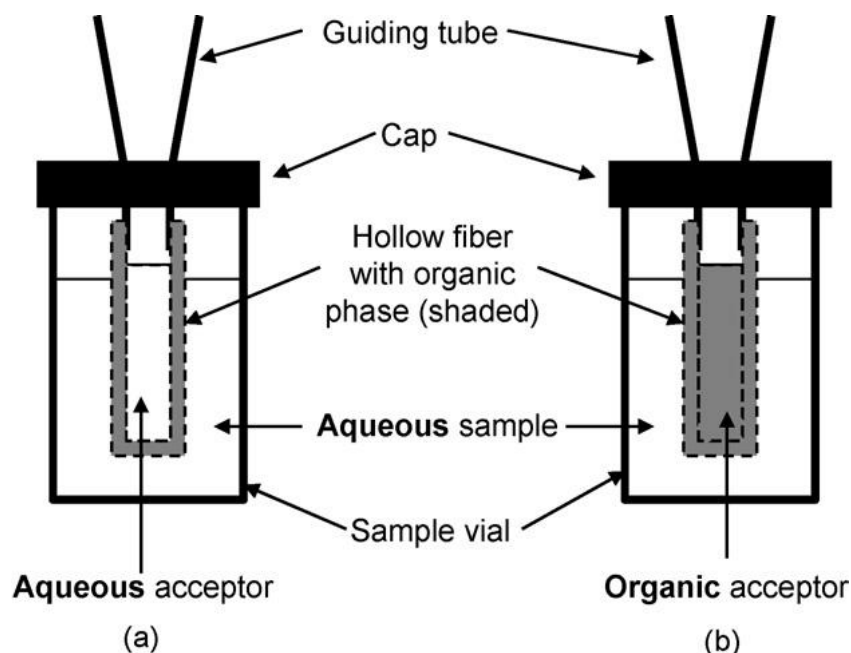


Obrázek 6: Princip HS-SDME [11]

GC microsyringe – mikrostříkačka, headspace – headspace, aqueous sample – vodný roztok vzorku, stirrer – míchadlo, syringe needle – jehla, organic drop – kapka organické fáze

3.2.2. Mikroextrakce využívající duté vlákno

V této metodě je před vlastní extrakcí porézní duté vlákno na chvíli ponořeno do organického rozpouštědla nemísitelného s vodou. Toto rozpouštědlo vytvoří uvnitř stěny dutého vlákna tenkou vrstvu. Stejným rozpouštědlem může být naplněn i vnitřní prostor vlákna, v tom případě se jedná o dvoufázovou HF-LPME. Po impregnaci stěn vlákna organickým rozpouštědlem se vlákno ponoří do nádoby naplněné vodným roztokem vzorku a dojde k vyextrahování vzorku do organického rozpouštědla přítomného jak ve stěně, tak ve vnitřním prostoru dutého vlákna. V případě třífázové HF-LPME tvoří vnitřní prostor vlákna vodný roztok, analyt je tak extrahován z vodného roztoku přes organické rozpouštědlo v pórech vlákna do vodného roztoku uvnitř dutého vlákna [9]. Princip shrnuje Obrázek 7.



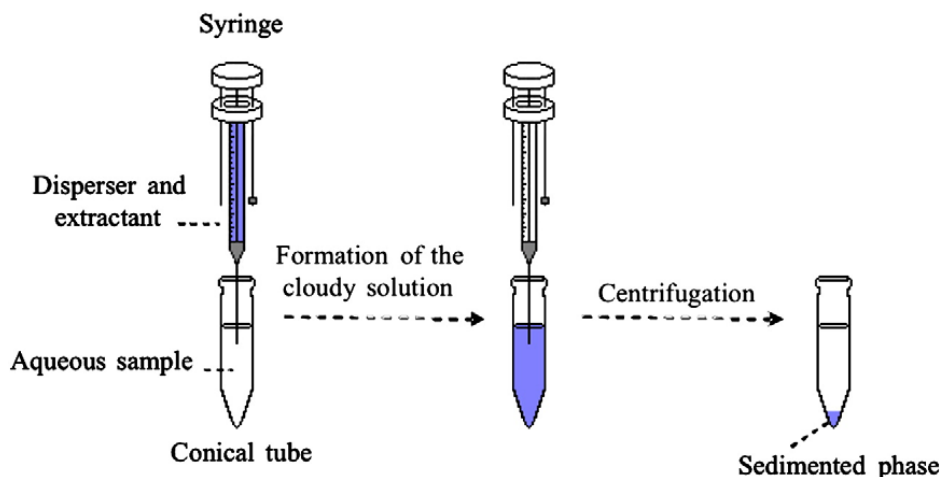
Obrázek 7: Princip (a) třífázové a (b) dvoufázové HF-LPME [13]

Guiding tube – hadička, cap – čepička, hollow fiber with organic phase – duté vlákno s organickou fází, aqueous sample – vodný roztok vzorku, sample vial – nádoba, aqueous acceptor – vodná fáze, organic acceptor – organická fáze

3.2.3. Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému

Mikroextrakce založená na tvorbě disperzního systému (DLLME – z anglického dispersive liquid – liquid microextraction) je metoda, kterou v roce 2006 představili Rezaee et al.

V této metodě je směs extrakčního rozpouštědla a disperzního činidla rychle vstříknuta do vodného roztoku vzorku. Vznikne tak tzv. „cloudy solution“, kterou tvoří drobné částice extrakčního rozpouštědla rozptýlené ve vodné fázi. Tyto částice se po centrifugaci usadí na kónickém dně zkumavky. Sediment je pak odebrán k detekci (Obrázek 8) [14].



Obrázek 8: Schematické znázornění DLLME [10]

Syringe – stříkačka, conical tube – kónická zkušavka, aqueous sample – vodný roztok vzorku, disperser and extractant – disperzní činidlo a extrakční rozpouštědlo, formation of the cloudy solution – vytvoření "cloudy solution", centrifugation – centrifugace, sedimented phase – sedimentovaná fáze

3.2.3.1. Přednosti DLLME

Výhodou této metody je velmi krátká doba extrakce, protože plocha mezi drobnými částicemi extrakčního rozpouštědla a roztokem vzorku po vytvoření „cloudy solution“ je velká, a dochází tak k rychlému ustanovení rovnováhy [10]. Mezi další výhody patří nízká spotřeba organických rozpouštědel, jednoduchost provedení a obvykle získání vysokého prekoncentračního faktoru [15, 16].

3.2.3.2. Nedostatky DLLME a možnosti jejich řešení

Nevýhodou je, že stejně jako u klasické extrakce z kapaliny do kapaliny musí být extrakční rozpouštědlo schopno extrahovat analyt a mít nízkou rozpustnost ve vodné fázi. V případě DLLME musí navíc mít vyšší hustotu než voda a musí tvořit stabilní „cloudy solution“ v přítomnosti disperzního činidla. Tyto požadavky však splňuje pouze omezený počet organických rozpouštědel, která jsou navíc značně toxická a ohrožují životní prostředí [10, 15, 16].

Naproti tomu disperzní činidlo musí být mísitelné jak s organickou, tak s vodnou fází. Zároveň ovšem může disperzní činidlo komplikovat separaci fází, proto je většinou nutné použít centrifugaci, která je časově náročná a v případě větších objemů i hůře proveditelná.

Nedostatky týkající se především vysokých nároků na vlastnosti použitých rozpouštědel bránily širší aplikovatelnosti DLLME v praxi. Překonat tyto překážky se podařilo především možností využít organických rozpouštědel lehčích než voda, případně odstraněním nutnosti centrifugace a užití disperzního činidla [15].

3.2.3.3. Automatizace DLLME v SIA systému

Nevýhodou DLLME také může být, že se celý postup provádí výhradně manuálně. Tento problém lze vyřešit její automatizací v SIA systému [15].

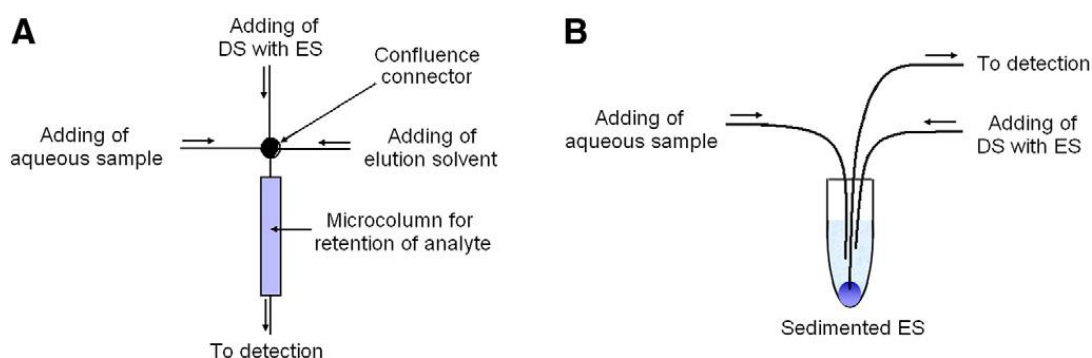
Anthemidis a Ioannou publikovali stanovení mědi a olova založené na prekoncentraci v automatizovaném on-line SI-DLLME systému s následnou plamenovou atomovou absorpční spektrometrií (FAAS). Disperzní činidlo, extrakční rozpouštědlo a chelatační činidlo byly on-line smíchány s proudem vodného roztoku vzorku, došlo k vytvoření komplexu a extrakci analytu z vodné fáze do kapiček extrakčního rozpouštědla. Poté byly kapičky organické fáze obsahující komplex analytu zachyceny v mikrokoloně, do mikrokolony bylo přidáno eluční činidlo a eluent detekován pomocí FAAS. Detekční limit byl v případě mědi 0,04 µg/l a 0,54 µg/l v případě olova, prekoncentrační faktory 560 a 265 [15, 17].

Stejní autoři také popsali stanovení olova a kadmia prostřednictvím obdobné metody, plamenová atomová absorpční spektrometrie zde však byla nahrazena elektrotermální atomovou absorpční spektrometrií (ETAAS). Limit detekce byl v případě olova 10 ng/l a 2 ng/ v případě kadmia, prekoncentrační faktory 80 a 34 [18].

Později publikovali tito autoři ještě stanovení stříbra opět s využitím FAAS. Limit detekce byl 0,15 µg/l, prekoncentrační faktor 186 [19].

Andruch et al. navrhli metodu, při níž byl nejdřív vzorek aspirován do mísící cívky SIA systému, a poté vypuštěn do plastové mikrokumavky, kam byla následně velkou rychlostí vypuštěna směs extrakčního rozpouštědla s nižší hustotou než voda, disperzního činidla a tzv. pomocného rozpouštědla. Toto rozpouštědlo bylo mísitelné s extrakčním rozpouštědlem i disperzním činidlem, mělo vyšší hustotu než voda a bylo nemísitelné s vodou. Vzhledem k těmto vlastnostem došlo po vytvoření směsi s extrakčním rozpouštědlem a disperzním činidlem k samovolnému usazení kapiček s extraktem na dně extrakční jednotky. Odtud byl pak extrakt odveden k detekční cele UV/VIS spektrofotometrického detektoru, aby mohla být změřena absorbance. Tímto způsobem stanovili thiokyanaté ionty s detekčním limitem 0,017 mg/l [20].

Schéma SI-DLLME systémů znázorňuje Obrázek 9.



Obrázek 9: Automatizace DLLME v SIA systému s využitím A) mikrokolony a B) pomocného rozpouštědla [15]

Adding of aqueous sample – přidavek vodného roztoku vzorku, adding of DS with ES – přidavek disperzního činidla a extrakčního rozpouštědla, adding of elution solvent – přidavek elučního činidla, microcolumn for retention of analyte – mikrokolona k zachycení analytu, to detection – k detekci, sedimented ES – sedimentované extrakční rozpouštědlo

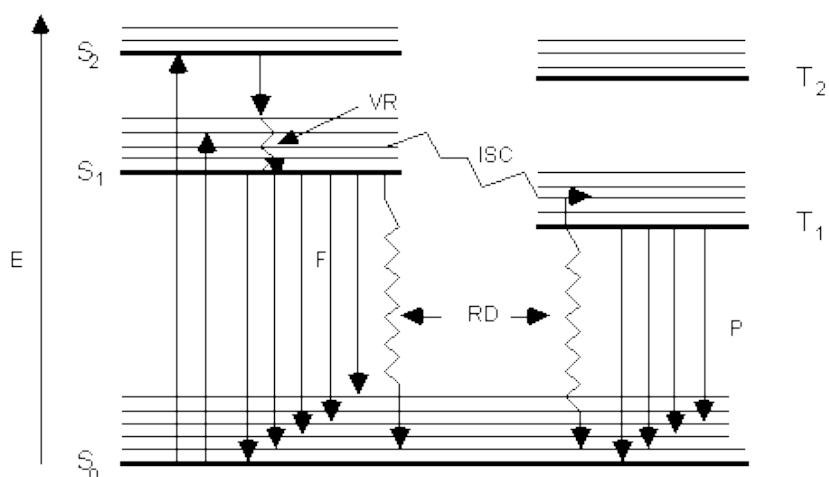
3.4. Fluorescenční detekce

Některé látky jsou schopny po uvedení do excitovaného stavu část energie emitovat ve formě tzv. luminiscenčního záření [21].

Pokud bylo excitovaného stavu dosaženo absorpcí fotonů, následná emise záření se nazývá fotoluminiscence. Pokud bylo tohoto stavu dosaženo pomocí chemické reakce, následná emise záření se nazývá chemiluminiscence.

Ve srovnání s molekulovou absorpční spektrometrií jsou luminiscenční metody až o tři řády citlivější [22].

Podle způsobu, jakým se excitované molekuly vrací na základní stav, rozlišujeme dva druhy fotoluminiscence: fluorescenci a fosforescenci. Jestliže dojde k zářivému přechodu do základního stavu S_0 ze základní vibrační hladiny excitovaného singletového stavu S_1 , jedná se o fluorescenci, jejíž doba dosvitu po ukončení excitace zářením se pohybuje mezi 10^{-6} a 10^{-9} s. Jestliže dojde k zářivému přechodu do základního stavu S_0 ze základní vibrační hladiny nejnižšího tripletního stavu T_1 , jedná se o fosforescenci, jev s dobou dosvitu řádově mezi 10^{-3} až 10^1 s [23]. Schéma energetických přechodů při fluorescenci a fosforescenci je zobrazeno na Obrázku 10.



Obrázek 10: Přechody mezi elektronově vibračními stavy v molekule [24]

E – energie, S_0 – základní stav, S_1, S_2 – excitované singletové stavy, T_1, T_2 – excitované tripletní stavy, F – fluorescence, P – fosforescence, VR, ISC, RD – nezářivé přechody

3.4.1. Faktory ovlivňující fluorescenci

Fluorescenci ovlivňuje jak struktura molekuly, tak okolní podmínky. Je především spojována s velkými rigidními rovinnými molekulami s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Intenzitu fluorescence zvyšují mj. v molekule přítomné nukleofilní skupiny, naopak ji snižuje:

- přítomnost elektron-akceptorových skupin
- solvatace analyzované látky použitým rozpouštědlem
- nízká viskozita rozpouštědla
- polární prostředí
- vysoká teplota
- přítomnost zhášeců

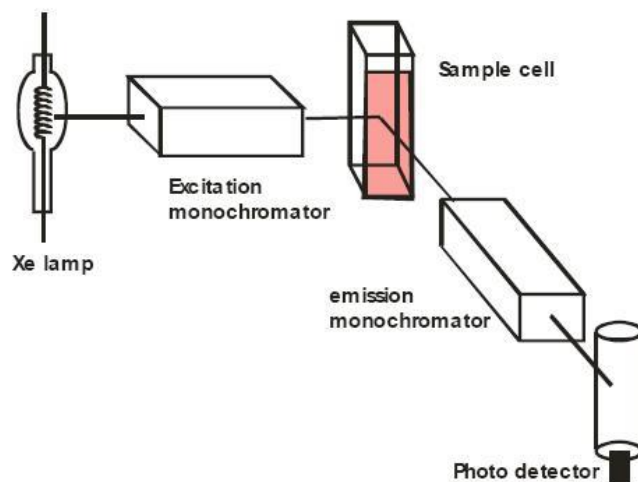
Fluorescenci některých látek výrazně ovlivňuje i pH roztoku, protože ionizací se mění struktura molekuly [21].

Při dostatečně nízkých hodnotách koncentrace roztoku roste intenzita fluorescence lineárně se zvyšující se koncentrací, při vyšších koncentracích však dochází ke koncentračnímu zhášení fluorescence [23].

3.4.2. Instrumentace

Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emisního záření při konstantní vlnové délce excitace popisuje emisní spektrum. Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitace při konstantní vlnové délce emise popisuje excitační spektrum.

Přístroje zaznamenávající excitační a emisní spektra se označují jako spektrofluorimetry. Jednopaprskový spektrofluorimetr se skládá z excitačního zdroje, excitačního monochromátoru, emisního monochromátoru, kyvety a detektoru (Obrázek 11).



Obrázek 11: Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru [25]

Xe lamp – xenonová lampa, excitation monochromator – excitační monochromátor, sample cell – cela se vzorkem, emission monochromator – emisní monochromátor, photo detector – detektor

Detekce probíhá kolmo ke směru paprsku vycházejícího z excitačního zdroje. Během záznamu excitačního spektra se mění pouze vlnová délka záření, které vychází z excitačního monochromátoru, zatímco během záznamu emisního spektra se mění pouze vlnová délka záření, které vychází z emisního monochromátoru.

Přístroje sloužící k měření fluorescence při určité vlnové délce jsou fluorimetry. Oproti spektrofluorimetrům využívají místo monochromátorů v podobě hranolů či mřížek jen optické filtry. Zdrojem excitačního záření většinou bývá rtuťová výbojka, v případě spektrofluorimetrů xenonová lampa [21].

3.4.3. Analytické využití

S fluorescenčními metodami se pracuje v mnoha různých oborech, např. ve farmacii, v potravinářství nebo analýze složek životního prostředí. V kvantitativní analýze se používá metoda kalibrační křivky, limit detekce může být až 10^{-12} mol/l. V kvalitativní analýze se využívá charakteristických průběhů excitačních a emisních spekter [26].

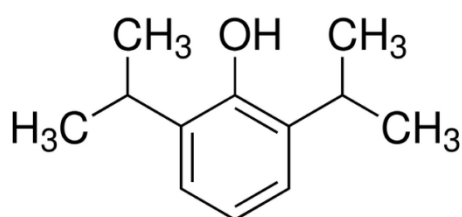
3.5. Propofol

3.5.1. Vlastnosti

Propofol patří mezi celková nitrožilní anestetika a používá se především k úvodu do celkové anestezie a v kombinaci s jinými anestetiky i k jejímu vedení. Nemá analgetické vlastnosti. Mechanismus účinku spočívá v usnadnění inhibice zprostředkované kyselinou γ -aminomáselnou (GABA) na $GABA_A$ receptorech. Účinek nastupuje velice rychle, již asi 30 až 40 sekund po aplikaci, a přetrvává cca 5 až 10 minut. Propofol se rychle distribuuje, zhruba z 98 procent se váže na plazmatické bílkoviny. Metabolizuje se v játrech a vylučování metabolitů probíhá převážně ledvinami.

K hlavním nežádoucím účinkům patří pokles srdečního tlaku, přechodná apnoe, změny srdeční frekvence, bolestivost v místě vpichu a spontánní pohyby během anestezie. Výhodou této látky je, že navozuje příjemné usnutí a probuzení a téměř nezpůsobuje poanestetickou nauzeu a zvracení, protože má určité antiemetické vlastnosti [27, 28, 29].

Systematický název propofolu je 2,6-diisopropylfenol (Obrázek 12) [30].



Obrázek 12: Vzorec propofolu [31]

Jedná se o bezbarvou nebo velmi slabě žlutou čirou kapalinu, velmi těžce se rozpouští ve vodě a je mísitelná s hexanem a methanolem. Uchovává se chráněna před světlem pod inertním plynem [30]. Vzhledem k lipofilním vlastnostem se ve farmaceutických přípravcích vyskytuje ve formě emulze typu olej ve vodě [27].

3.5.2. Stanovení propofolu

3.5.2.1. Lékopisná metoda

Dle Českého lékopisu 2009 se propofol stanovuje pomocí kapalinové chromatografie. Zkoušený roztok se připraví rozpuštěním 0,240 g propofolu v hexanu R a zředěním na 100,0 ml. Porovnávací roztok se připraví rozpuštěním 0,240 g propofolu CRL v hexanu R a zředěním na 100,0 ml. Chromatografický postup se provádí za použití kolony o délce 20 cm a vnitřním průměru 4,6 mm, stacionární fáze, kterou je silikagel pro chromatografii R (5 µm), a mobilní fáze, kterou je směs objemových dílů ethanolu bezvodého R, acetonitrilu R a hexanu R (1,0 + 7,5 + 990). Průtoková rychlost je 2,0 ml/min, detekce se provádí spektrofotometrickým detektorem, 275 nm. Nastříkne se 10 µl zkoušeného roztoku a 10 µl porovnávacího roztoku a chromatogram se zaznamenává po dobu sedminásobku retenčního času propofolu. Obsah propofolu se vypočítá za použití deklarovaného obsahu propofolu CRL [30].

3.5.2.2. Stanovení propofolu v biologickém materiálu

Existuje řada studií zabývajících se stanovením propofolu v rozličném biologickém materiálu, jako je krev, plazma, sérum či cerebrospinalní tekutina [32]. V těchto studiích se pro stanovení využívaly např. tyto metody:

- HPLC kombinovaná s UV spektrometrií [33]
- HPLC kombinovaná s fluorescenční detekcí [34]
- HPLC kombinovaná s hmotnostní spektrometrií (MS) [35]
- Plynová chromatografie kombinovaná s MS (GC – MS) [36]
- Mikroextrakce tuhou fází využívající headspace (HS-SPME) kombinovaná s plynovou chromatografií a MS (GC – MS) [37]

3.5.2.3. Stanovení propofolu v léčivých přípravcích

Oproti stanovení propofolu v biologickém materiálu není mnoho prací věnujících se jeho stanovení ve farmaceutických přípravcích. Z poslední doby byla nalezena pouze jedna studie zabývající se tímto tématem. Konkrétně to byla studie, kterou provedli Pickl et al. Pro stanovení propofolu použili HS-SPME kombinovanou s GC – MS. Detekční limit byl 3,3 µg/l [32].

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

Acetonitril – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Amylacetát – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Cyklohexanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

2,6-Diisopropylfenol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Ethanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Hexan – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Hexanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Hydroxid sodný – Penta, Chrudim, Česká Republika

Kyselina chlorovodíková 35% – Penta, Praha, Česká Republika

Oktanol – Sigma-Aldrich, Praha, Česká Republika

Voda destilovaná – připravená systémem Milli-Q RG, Millipore, Bedford MA, USA

4.1.2. Přístroje a software

Detektor PMT, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Extrakční jednotka

FIALab 3500 (s osmicestným ventilem), FIALab Instruments, Bellevue, USA

Fluorescenční průtoková cela

Pístové čerpadlo, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Software FIALab pro Windows, verze 5.9.321, FIALab Instruments, Bellevue, USA

Šesticestný ventil, FIALab Instruments, Bellevue, USA

4.2. Pracovní postup

4.2.1. Příprava roztoků

4.2.1.1. Zásobní roztoky

Zásobní roztok propofolu o koncentraci 800 µg/ml byl připraven navážením 0,2 g propofolu a doplněním 0,1M hydroxidem sodným (NaOH) po značku 250 ml odměrné baňky.

0,1M roztok NaOH byl připraven navážením 1 g NaOH a doplněním destilovanou vodou po značku 250 ml odměrné baňky.

1M roztok kyseliny chlorovodíkové (HCl) byl připraven ředěním 8,6 ml 35% HCl destilovanou vodou ve 100 ml odměrné baňce.

4.2.1.2. Kalibrační roztoky

Ze zásobního roztoku propofolu (800 µg/ml) byly připraveny kalibrační roztoky ředěním 0,1M roztokem hydroxidu sodného ve 25 ml odměrných baňkách. Koncentrace kalibračních roztoků byly 8 µg/ml, 16 µg/ml, 32 µg/ml, 48 µg/ml, 64 µg/ml, 80 µg/ml, 96 µg/ml, 128 µg/ml a 256 µg/ml (Tabulka 1).

Tabulka 1: Příprava kalibračních roztoků

| Koncentrace roztoku (µg/ml) | Objem zásobního roztoku propofolu (ml) | Objem 0,1M NaOH (ml) |
|-----------------------------|--|----------------------|
| 8 | 0,25 | 24,75 |
| 16 | 0,50 | 24,50 |
| 32 | 1,00 | 24,00 |
| 48 | 1,50 | 23,50 |
| 64 | 2,00 | 23,00 |
| 80 | 2,50 | 22,50 |
| 96 | 3,00 | 22,00 |
| 128 | 4,00 | 21,00 |
| 256 | 8,00 | 17,00 |

4.2.2. Výběr extrakčního rozpouštědla

Vybíralo se mezi pěti organickými látkami: amylacetátem, cyklohexanolem, hexanem, hexanolem a oktánolem. Byly provedeny reakce ve zkumavkách, a to tak, že k půl mililitru organického rozpouštědla byly vstříknuty čtyři mililitry roztoku propofolu v NaOH o koncentraci 256 µg/ml. Následně byla ještě přidána kapka 35% kyseliny chlorovodíkové a se zkumavkou bylo jemně zatřepáno. Výběr byl proveden na základě vizuálního porovnání intenzity zbarvení organické vrstvy propofolem a oddělení vodné a organické vrstvy.

4.2.3. Výběr disperzního činidla

Disperzní činidlo bylo vytipováno podle informací v článku Automated on-line dispersive liquid – liquid microextraction based on sequential injection system (Andruch et al.) [20]. Poté byla pro ověření vhodnosti činidla provedena reakce ve zkumavce následujícím způsobem: jeden mililitr extrakčního činidla byl smíchán s jedním a půl mililitrem disperzního činidla a nakonec byly přidány čtyři mililitry roztoku propofolu v NaOH o koncentraci 256 $\mu\text{g/ml}$ a s obsahem bylo jemně zatřepáno.

4.2.4. Výběr extrakční jednotky

Bylo vybíráno mezi plastovou mikrozukmavkou o objemu 1,5 ml (Obrázek 13) a skleněnou odměrnou baňkou o objemu 5 ml (Obrázek 14).



Obrázek 13: Mikrozukmavka [38]

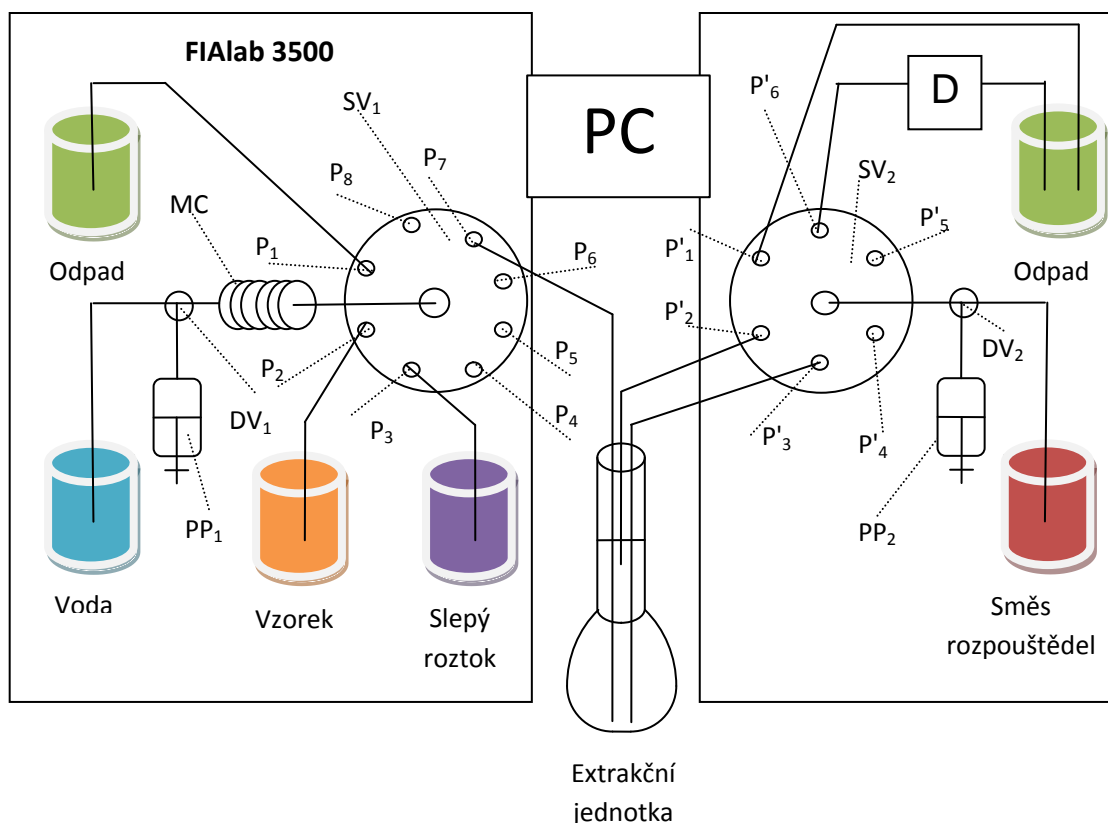


Obrázek 14: Odměrná baňka [39]

4.2.5. Optimalizace SIA systému

Byl vytvořen program, který zajišťoval nasátí příslušných reagensů, jejich promíslení, extrakci, oddělení fází, transport k fluorescenčnímu detektoru a změření intenzity fluorescence. Primární filtr detektoru propouštěl záření

o vlnové délce 270 nm až 410 nm, sekundární filtr nepropouštěl záření o vlnové délce nižší než 265 nm. Každé měření bylo provedeno třikrát a slepý roztok byl proměřen rovněž vždy třikrát. Všechna měření byla prováděna v SIA systému se dvěma ventily a pumpami. První pumpa a osmicestný ventil byly součástí systému FIALab 3500 a sloužily k aspiraci nosného proudu, vzorku a slepého roztoku a jejich vypouštění do extrakční jednotky. Druhá pumpa a šesticestý ventil sloužily k aspiraci extrakční směsi, její vypuštění do extrakční jednotky a po extrakci k transportu extraktu do detektoru. Schéma systému je na Obrázku 15.



Obrázek 15: Schéma systému

PP₁ – první pístová pumpa 1, DV₁ – dvoucestný ventil, MC – mísící cívka, SV₁ – selekční ventil 1, P₁-P₈ – porty selekčního ventilu 1, PP₂ – pístová pumpa 2, DV₂ – dvoucestný ventil 2, SV₂ – selekční ventil 2, P'₁-P'₆ – porty selekčního ventilu 2, D – detektor, PC – počítač

4.2.5.1. Optimalizace způsobu mísení

Nejprve bylo zjišťováno, zda je vhodnější mísit vzorek s extrakční směsí v mísící cívice nebo přímo v extrakční jednotce. V případě extrakční jednotky se rovněž zkoumalo, jestli je výhodnější jednorázové přidání extrakční směsi nebo střídavě přidávat extrakční směs a vzorek stejně jako při mísení v mísící cívice. Byl měřen roztok o koncentraci 16 $\mu\text{g/ml}$. Byly proměřeny tři různé způsoby mísení:

- 1 – 1/8 z celkového objemu vzorku, 1/4 z celkového objemu extrakční směsi a znovu 1/8 z celkového objemu vzorku byly v tomto pořadí aspirovány do mísící cívky a následně vypuštěny do extrakční jednotky. Postup se opakoval třikrát.
- 2 – Mísení přímo v extrakční jednotce, přičemž do extrakční jednotky byla vypuštěna polovina z celkového objemu vzorku, poté extrakční směs a nakonec druhá polovina objemu vzorku. Hadička přivádějící roztoky do extrakční jednotky byla přitom umístěna na dně extrakční jednotky, aby byl při vypouštění extrakční směsi s hustotou nižší než voda zajištěn její kontakt s celým objemem vzorku.
- 3 – Mísení přímo v extrakční jednotce, přičemž do extrakční jednotky byly střídavě vypouštěny extrakční směs a vzorek, a to celkem čtyřikrát. Umístění hadičky bylo stejné jako v předchozím případě.

Výsledky shrnuje Tabulka 2 a Obrázek 16 v kapitole 5.4.1.

4.2.5.2. Optimalizace rychlosti průtoku detektorem

Po nalezení optimálního způsobu mísení bylo zkoumáno, při jaké rychlosti průtoku detektorem je rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku největší. Byl měřen roztok o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky shrnuje Tabulka 3 a Obrázek 17 v kapitole 5.4.2.

4.2.5.3. Optimalizace objemu extrakční směsi

Byly testovány tři různé objemy extrakční směsi – 300 μl , 400 μl a 500 μl . Byl měřen roztok o koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky shrnuje Tabulka 4 a Obrázek 18 v kapitole 5.4.3.

4.2.5.4. Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru

Po nalezení optimálního objemu extrakční směsi byl testován objem dávkovaný do detektoru. Byl měřen roztok o koncentraci 32 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky shrnuje Tabulka 5 a Obrázek 19 v kapitole 5.4.4.

4.2.5.5. Studium možnosti zvýšení extrakční účinnosti úpravou pH

Bylo zjišťováno, jestli dochází při snížení pH přidavkem kyseliny chlorovodíkové ke zvýšení extrakční účinnosti. Před vlastním měřením bylo reakcí ve zkumavce zkoumáno, jaké množství kyseliny je třeba k dosažení pH o hodnotě 8. Byl měřen roztok o koncentraci 8 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky shrnuje Tabulka 6 a Obrázek 20 v kapitole 5.4.5.

4.2.5.6. Optimalizace dalších parametrů a výsledný program

Výsledný program byl sestaven na základě předchozích experimentů a optimalizace ještě dalších parametrů specifických pro průtokový systém (kapitola 5.4.6.).

4.2.5.7. Kalibrační závislost

Po nalezení optimálních podmínek byla proměřena kalibrační závislost. Nejprve byl změřen slepý roztok, poté vzorky o koncentracích 8 – 256 $\mu\text{g/ml}$. Výsledky

shrnují Tabulky 7 a 8 a Obrázky 21, 22 a 23 v kapitole 5.4.7. Byl spočítán limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) podle vzorců:

$$\text{LOD} = 3 * \text{SD slepého roztoku} + \text{Průměr hodnot slepého roztoku} [40]$$

$$\text{LOQ} = 10 * \text{SD slepého roztoku} + \text{Průměr hodnot slepého roztoku} [40]$$

Získané hodnoty byly dosazeny do rovnice regrese kalibrační přímky.

4.2.5.8. Opakovatelnost

Na závěr byla ověřena opakovatelnost měření, a to pro koncentraci 16 µg/ml a 64 µg/ml. Výsledky shrnuje Tabulka 9 v kapitole 5.4.8.

5. Výsledky

5.1. Výběr extrakčního rozpouštědla

Za extrakční rozpouštědlo byl zvolen amylacetát, protože v jeho případě docházelo k nejdokonalejšímu oddělení vodné fáze od organické. Hlavní výhodnou vlastností amylacetátu pro extrakci je jeho nízká rozpustnost ve vodě. Výhodou může být i relativně nižší toxicita ve srovnání s některými jinými organickými rozpouštědly s hustotou nižší než voda [20].

5.2. Výběr disperzního činidla

Po vytipování ve zmíněném článku [20] a provedení testu ve zkumavce s propofolem a amylacetátem byl za disperzní činidlo zvolen acetonitril. Poměr amylacetátu ku acetonitrilu byl pro všechna měření v SIA systému ponechán na hodnotě 1:1,5.

5.3. Výběr extrakční jednotky

Byla vybrána skleněná odměrná baňka o objemu 5 ml, protože její úzké hrdlo umožňovalo snadnější odebrání extraktu k detekci a širší spodní část umožňovala pracovat s větším objemem vzorku a dosáhnout tak vyššího zakoncentrování než v případě použití mikrozkuhavky s objemem 1,5 ml.

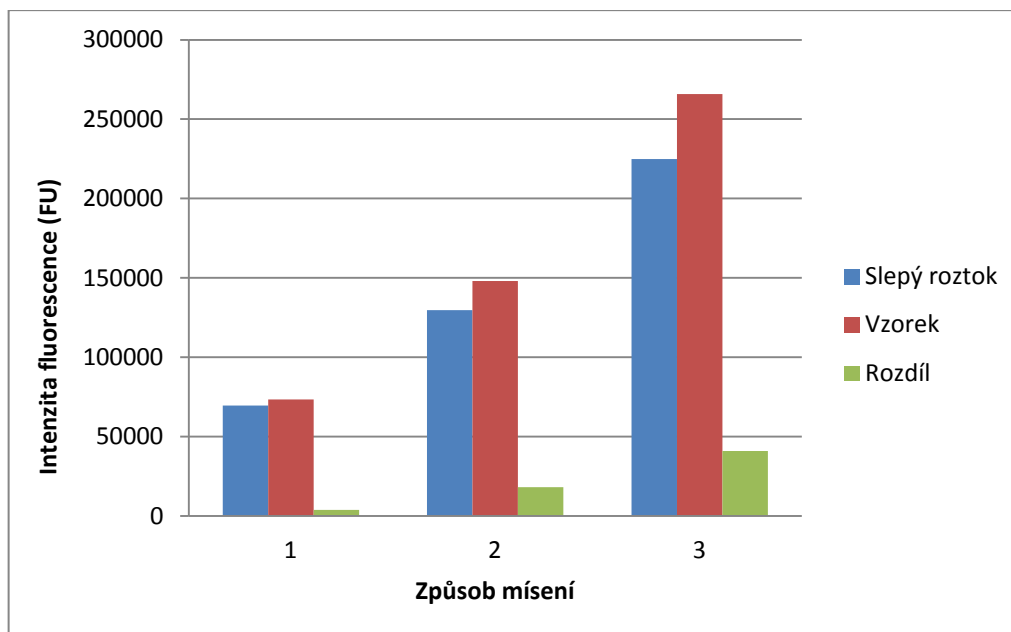
5.4. Optimalizace SIA systému

5.4.1. Optimalizace způsobu mísení

Cílem pokusu bylo zjistit, při jakém z uvedených způsobu mísení bude odezva detektoru největší.

Tabulka 2: Optimalizace způsobu mísení

| Způsob mísení | 1 | | 2 | | 3 | |
|--|--------|--------|---------|---------|---------|---------|
| | SL | VZ | SL | VZ | SL | VZ |
| 1 | 63 366 | 73 533 | 130 976 | 149 640 | 225 638 | 269 114 |
| 2 | 71 980 | 72 533 | 128 156 | 146 507 | 223 368 | 261 724 |
| 3 | 73 186 | 74 340 | 130130 | 147 857 | 225 565 | 266 836 |
| Průměr (FU) | 69 511 | 73 469 | 129 754 | 148 001 | 224 857 | 265 891 |
| SD | 5 355 | 905 | 1 447 | 1 571 | 1 290 | 3 784 |
| RSD (%) | 7,70 | 1,23 | 1,12 | 1,06 | 0,57 | 1,42 |
| Rozdíl FU _{VZ} -FU _{SL} | | 3 958 | | 18 247 | | 41 034 |



Obrázek 16: Závislost intenzity fluorescence na způsobu mísení

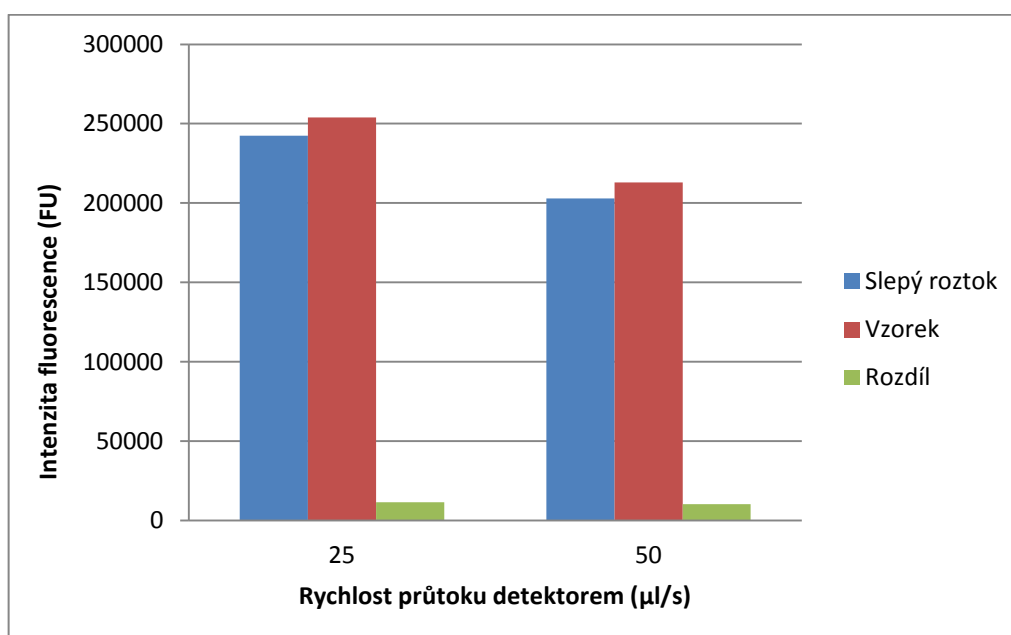
Z Tabulky 2 a Obrázku 16 lze usoudit, že nejlepší je způsob mísení typu 3, tj. postupné mísení extrakční směsi a vzorku přímo v extrakční jednotce. Rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku je právě v tomto případě nejvyšší. Tento způsob mísení tak byl používán při dalších měřeních.

5.4.2. Optimalizace rychlosti průtoku detektorem

Byly proměřeny dvě rychlosti průtoku detekční celou – 25 a 50 $\mu\text{l/s}$.

Tabulka 3: Optimalizace rychlosti průtoku detektorem

| Rychlost průtoku detektorem ($\mu\text{l/s}$) | 25 | | 50 | |
|---|---------|---------|---------|---------|
| | SL | VZ | SL | VZ |
| Měření | | | | |
| 1 | 245 337 | 253 627 | 202 892 | 211 012 |
| 2 | 243 126 | 255 433 | 201 822 | 214 112 |
| 3 | 239 006 | 252 979 | 203 793 | 214 118 |
| Průměr (FU) | 242 490 | 254 013 | 202 836 | 213 081 |
| SD | 3 213 | 1 272 | 987 | 1792 |
| RSD (%) | 1,33 | 0,50 | 0,49 | 0,84 |
| Rozdíl $FU_{VZ}-FU_{SL}$ | | 11 523 | | 10 245 |



Obrázek 17: Závislost intenzity fluorescence na rychlosti průtoku detektorem

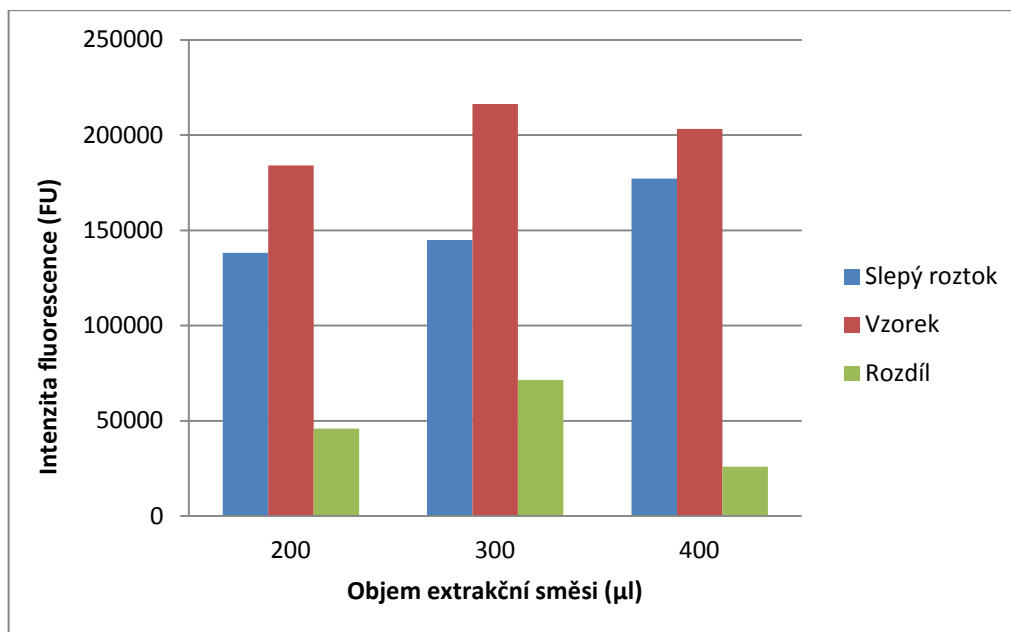
Na Obrázku 17 je vidět, že rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku je v případě obou rychlostí téměř stejný. V následujících měřeních byla používána rychlost 25 $\mu\text{l/s}$ kvůli podrobnějšímu změření signálu detektorem.

5.4.3. Optimalizace objemu extrakční směsi

Při optimalizaci objemu extrakční směsi byla snaha najít takový objem, který by umožnil co nejvyšší zakoncentrování analytu ze vzorku a zároveň umožnil snadnou aspiraci z extrakční jednotky pro následnou detekci.

Tabulka 4: Optimalizace objemu extrakční směsi

| Objem extrakční směsi (μl) | 200 | | 300 | | 400 | |
|--|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | SL | VZ | SL | VZ | SL | VZ |
| 1 | 141 268 | 176 342 | 145 023 | 217 191 | 178 602 | 203 291 |
| 2 | 134 990 | 185 932 | 144 770 | 215 129 | 173 040 | 202 975 |
| 3 | – | 189 738 | 144 794 | 216 805 | 179 817 | 203 103 |
| Průměr (FU) | 138 129 | 184 004 | 144 862 | 216 375 | 177 153 | 203 123 |
| SD | 4 439 | 6 903 | 140 | 1 096 | 3 613 | 159 |
| RSD (%) | 3,21 | 3,75 | 0,10 | 0,51 | 2,04 | 0,08 |
| Rozdíl $FU_{VZ}-FU_{SL}$ | | 45 875 | | 71 513 | | 25 970 |



Obrázek 18: Závislost intenzity fluorescence na objemu extrakční směsi

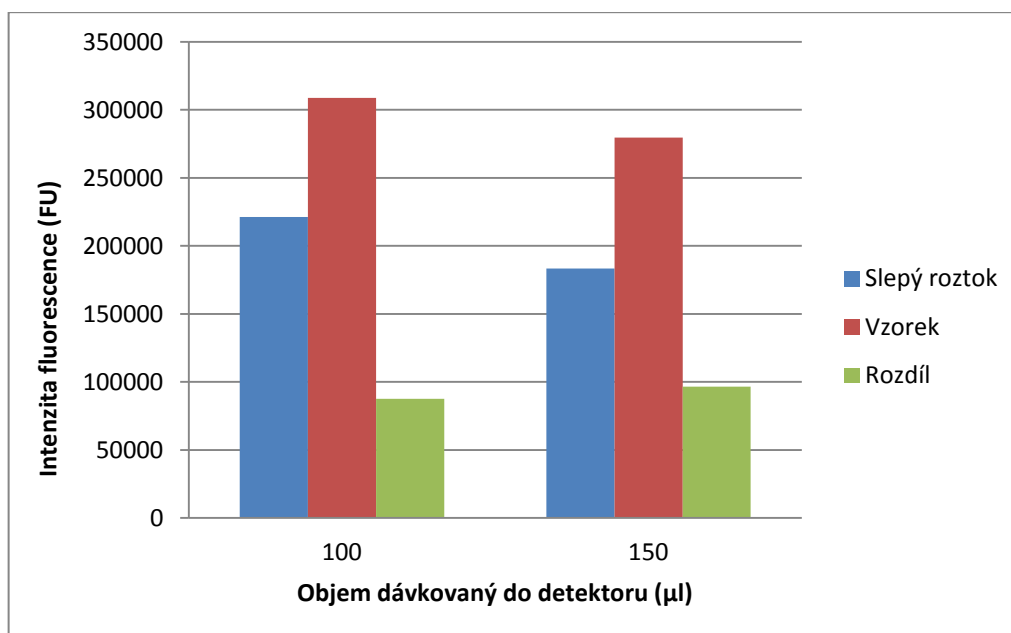
Z Tabulky 4 a Obrázku 18 vyplývá, že optimální objem extrakční směsi je 300 μl. Při použití 400 μl extrakční směsi je rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku menší. Při použití 200 μl extrakční směsi bylo již značně ztíženo odebrání potřebného množství kapaliny z extrakční jednotky k detekci, v případě slepého roztoku se ani nepodařilo při detekci zaznamenat třetí signál, a tak je při tomto objemu snížena opakovatelnost, a tím i přesnost měření. Během následujících měření bylo proto používáno 300 μl extrakční směsi.

5.4.4. Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru

Vzhledem k výsledkům předchozího pokusu byl rozsah velikostí objemů dávkovaných do detektoru velmi omezen, protože z extraktu bylo ještě před vlastní detekcí odčerpáváno 75 μl na promytí hadičky, jak je uvedeno v kapitole 5.4.6. Proto byly testovány pouze dva objemy – 100 μl a 150 μl, větší objem by téměř nebylo možné z extraktu odebrat, menší objem by zas nebyl výhodný při vlastní detekci.

Tabulka 5: Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru

| Objem dávkovaný do detektoru (μl) | 100 | | 150 | |
|---|---------|---------|---------|---------|
| | SL | VZ | SL | VZ |
| 1 | 222 366 | 305 543 | 180 057 | 277 283 |
| 2 | 220 622 | 309 527 | 181 744 | 280 651 |
| 3 | 220 322 | 310 784 | 187 826 | 281 021 |
| Průměr (FU) | 221 103 | 308 618 | 183 209 | 279 652 |
| SD | 1 104 | 2 736 | 4 086 | 2 060 |
| RSD (%) | 0,50 | 0,89 | 2,23 | 0,74 |
| Rozdíl FU_{VZ}-FU_{SL} | | 87 515 | | 96 443 |



Obrázek 19: Závislost intenzity fluorescence na objemu dávkovaného do detektoru

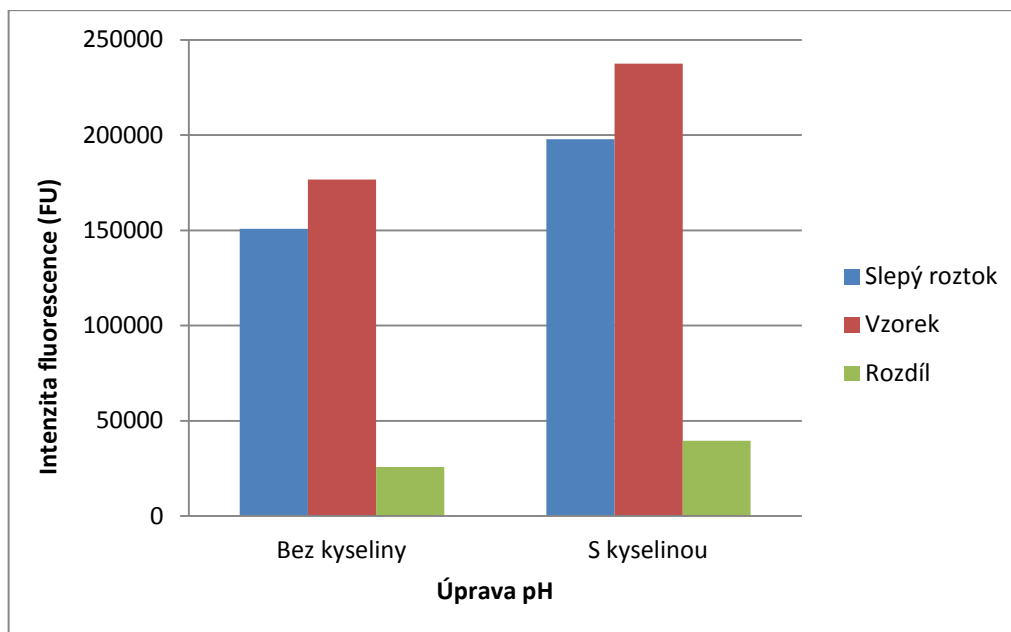
Z Tabulky 5 a Obrázku 19 je patrné, že o něco větší rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku je v případě 150 µl dávkovaných do detektoru. Takto velký objem se však již velmi těžko odebíral a měření muselo být několikrát opakováno, než se podařilo odebrat pouze horní fázi. Proto bylo v následujících měřeních do detektoru dávkováno jen 100 µl.

5.4.5. Studium možnosti zvýšení extrakční účinnosti úpravou pH

Před měřením v SIA systému byla provedena reakce ve zkumavce a bylo zjištěno, že ke 4200 µl vzorku je třeba přidat 350 µl 1M kyseliny chlorovodíkové, aby došlo ke snížení pH na hodnotu 8.

Tabulka 6: Závislost intenzity fluorescence na úpravě pH

| Úprava pH | Bez kyseliny | | S kyselinou | |
|---|--------------|---------|-------------|---------|
| | SL | VZ | SL | VZ |
| Měření | | | | |
| 1 | 150 147 | 172 472 | 198 019 | 240 522 |
| 2 | 149 867 | 176 052 | 197 802 | 233 376 |
| 3 | 152 287 | 181 193 | 197 626 | 238 330 |
| Průměr (FU) | 150 767 | 176 572 | 197 816 | 237 409 |
| SD | 1 324 | 4 384 | 197 | 3 661 |
| RSD (%) | 0,88 | 2,48 | 0,10 | 1,54 |
| Rozdíl FU_{VZ}-FU_{SL} | | 25 805 | | 39 593 |



Obrázek 20: Závislost intenzity fluorescence na úpravě pH

Z Tabulky 6 a Obrázku 20 vyplývá, že byla ověřena možnost zvýšení extrakční účinnosti snížením pH. Po přidavku 350 μ l kyseliny byl rozdíl mezi intenzitou fluorescence vzorku a intenzitou fluorescence slepého roztoku větší než bez přidavku kyseliny. Přesto nebyl přidavek kyseliny zahrnut do výsledného programu, protože přidavek kyseliny zhoršil symetrii píků.

5.4.6. Optimalizace dalších parametrů a výsledný program

Na základě předchozích experimentů byly ve výsledném programu nastaveny tyto parametry: mísení extrakční směsi a vzorku až přímo v extrakční jednotce, přičemž extrakční směs i vzorek byly střídavě přidávány po třetinách, rychlost průtoku detektorem 25 μ l/s, objem extrakční směsi 300 μ l, objem dávkovaný do detektoru 100 μ l.

Kromě toho byly v průběhu měření optimalizovány některé další parametry, například průtoková rychlost extrakční směsi do extrakční jednotky. Po sérii

měření rychlostí v rozsahu 50 – 200 $\mu\text{l/s}$ byl uspokojivý signál získán pouze při rychlosti 200 $\mu\text{l/s}$, v ostatních případech nebyly změřeny v podstatě žádné signály, zřejmě kvůli nedostatečné extrakci. Průtoková rychlost extrakční směsi do extrakční jednotky tak byla pro následující měření ponechána na hodnotě 200 $\mu\text{l/s}$.

Dále byl nastaven krok, který zajišťoval promytí hadičky aspirující extrakt, protože bylo zjištěno, že bez tohoto kroku se zpočátku detekce téměř vždy objevovaly bubliny, rovněž byla měněna délka pauzy po přidání třetí části vzorku, jež měla za cíl poskytnout dostatečný čas pro úplné promíslení a následné rozdělení jednotlivých fází. Ke konci zas byla pauza nahrazena krokem, kdy byl detektor před vlastní detekcí promyt 200 μl extrakční směsí. Tento krok ovšem do výsledného programu zahrnut nebyl. Sice došlo k odstranění bublin, ale symetrie píků byla zhoršena.

Ovládací program

| | |
|--|--|
| Loop Start (#) 3 P2 Command (?) KOR P2 Valve In P2 Flowrate (microliter/sec) 200 P2 Aspirate (microliter) 1000 P2 Delay Until Done | Aspirace extrakční směsi |
| P2 Valve Out P2 Delay Until Done mv port 3 P2 Delay Until Done P2 Dispense (microliter) 100 P2 Delay Until Done | Vypouštění první části extrakční směsi do extrakční jednotky |
| SyringePump Command (?) KOR SyringePump Valve In SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 1000 SyringePump Delay Until Done | Aspirace nosného proudu (destilované vody) |

| | |
|--|---|
| <p>SyringePump Valve Out SyringePump Delay Until Done Analyte New Sample Name Propofol Multiposition Valve port 2 SyringePump Delay Until Done SyringePump Aspirate (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Aspirace první části vzorku</p> |
| <p>Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Dispense (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Vypouštění první části vzorku do extrakční jednotky</p> |
| <p>mv port 3 P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 200 P2 Dispense (microliter) 100 P2 Delay Until Done</p> | <p>Vypouštění druhé části extrakční směsi do extrakční jednotky</p> |
| <p>Multiposition Valve port 2 SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Aspirace druhé části vzorku</p> |
| <p>Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Dispense (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Vypouštění druhé části vzorku do extrakční jednotky</p> |
| <p>mv port 3 P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 200 P2 Dispense (microliter) 100 P2 Delay Until Done</p> | <p>Vypouštění třetí části extrakční směsi do extrakční jednotky</p> |
| <p>Multiposition Valve port 2 SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Aspirace třetí části vzorku</p> |

| | |
|---|---|
| <p>Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Dispense (microliter) 1500 SyringePump Delay Until Done</p> <p>Delay (sec) 30</p> | <p>Vypouštění třetí části vzorku do extrakční jednotky, poté třicetisekundová pauza</p> |
| <p>mv port 2 P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 25 P2 Aspirate (microliter) 75 P2 Delay Until Done mv port 1 P2 Delay Until Done P2 Dispense (microliter) 100 P2 Delay Until Done</p> | <p>Promytí hadičky aspirující extrakt</p> |
| <p>mv port 2 P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 25 P2 Aspirate (microliter) 100 P2 Delay Until Done</p> | <p>Aspirace vrchní fáze z extrakční jednotky</p> |
| <p>mv port 6 P2 Delay Until Done PMT Start Scans P2 Empty P2 Delay Until Done PMT Stop Scans</p> | <p>Měření fluorescence</p> |
| <p>Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 4000 SyringePump Delay Until Done Multiposition Valve port 1 SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 200 SyringePump Empty SyringePump Delay Until Done Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 1000 SyringePump Delay Until Done</p> | <p>Vyprázdnění</p> |

| | |
|---|--|
| Multiposition Valve port 1 SyringePump Delay Until Done SyringePump Empty SyringePump Delay Until Done Loop End | |
|---|--|

Při měření slepého roztoku byl program totožný, pouze příkaz Multiposition Valve port 2 byl nahrazen příkazem Multiposition Valve port 3.

Kromě programu pro vlastní měření byly sestaveny dva promývací programy, při kterých se nejdříve část průtokového systému promyla ethanolem, a poté se celý systém promyl destilovanou vodou.

Program na promytí části průtokového systému ethanolem

| | |
|--|---|
| Loop Start (#) 1 P2 Command (?) KOR P2 Valve In P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 100 P2 Aspirate (microliter) 4800 P2 Delay Until Done P2 Valve Out P2 Delay Until Done | Promytí druhé pumpy ethanolem |
| mv port 2 P2 Delay Until Done P2 Empty P2 Delay Until Done mv port 3 P2 Delay Until Done P2 Aspirate (microliter) 5000 P2 Delay Until Done mv port 6 P2 Delay Until Done P2 Empty P2 Delay Until Done Loop End | Promytí extrakční jednotky ethanolem |

Program na promytí průtokového systému destilovanou vodou

| | |
|--|--|
| <p>Loop Start (#) 1</p> <p>P2 Command (?) KOR P2 Valve In P2 Delay Until Done P2 Flowrate (microliter/sec) 100 P2 Aspirate (microliter) 4800 P2 Delay Until Done P2 Valve Out P2 Delay Until Done</p> | <p>Promytí druhé pumpy destilovanou vodou</p> |
| <p>mv port 2 P2 Delay Until Done P2 Empty P2 Delay Until Done mv port 3 P2 Delay Until Done P2 Aspirate (microliter) 5000 P2 Delay Until Done mv port 6 P2 Delay Until Done P2 Empty P2 Delay Until Done</p> | <p>Promytí extrakční jednotky destilovanou vodou</p> |
| <p>SyringePump Command (?) KOR SyringePump Valve In SyringePump Delay Until Done SyringePump Flowrate (microliter/sec) 100 SyringePump Aspirate (microliter) 1000 SyringePump Delay Until Done SyringePump Valve Out SyringePump Delay Until Done Multiposition Valve port 7 SyringePump Delay Until Done SyringePump Empty SyringePump Delay Until Done SyringePump Aspirate (microliter) 1200 SyringePump Delay Until Done Multiposition Valve port 1 SyringePump Delay Until Done SyringePump Empty SyringePump Delay Until Done</p> <p>Loop End</p> | <p>Promytí první pumpy destilovanou vodou</p> |

5.4.7. Kalibrační závislost

Kalibrační závislost byla testována v koncentračním rozmezí 8 až 256 µg/ml.

Nejprve byl proměřen slepý roztok (Tabulka 7).

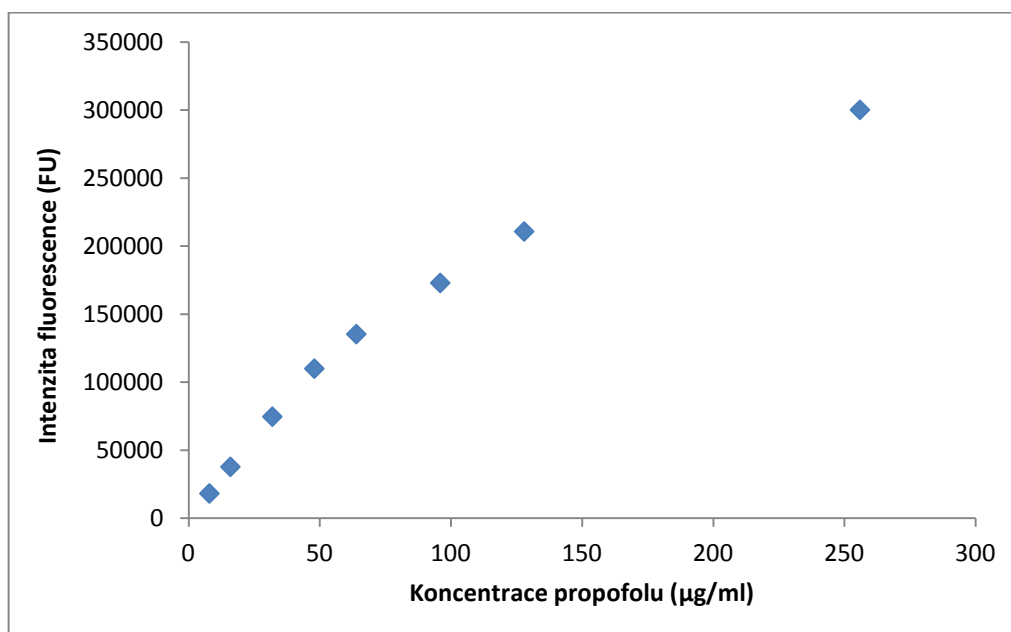
Tabulka 7: Slepý roztok

| Měření | FU |
|--------------------|---------|
| 1 | 196 766 |
| 2 | 196 634 |
| 3 | 200 065 |
| Průměr (FU) | 197 822 |
| SD | 1 944 |
| RSD (%) | 0,98 |

Tabulka 8: Kalibrační závislost

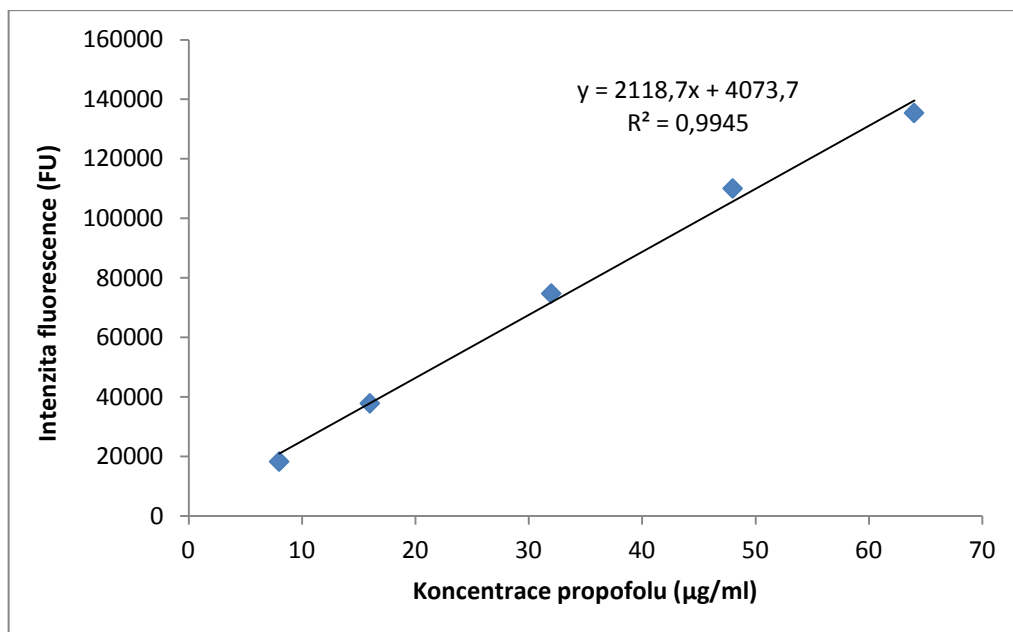
| Koncentrace propofolu (µg/ml) | 8 | 16 | 32 | 48 |
|--|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 213 074 | 229 244 | 258 554 | 312 584 |
| 2 | 216 196 | 234 048 | 278 257 | 299 255 |
| 3 | 219 028 | 243 719 | 280 845 | 311 744 |
| Průměr (FU) | 216 099 | 235 670 | 272 552 | 307 861 |
| SD | 2 978 | 7 373 | 12 191 | 7 465 |
| RSD (%) | 1,38 | 3,13 | 4,47 | 2,42 |
| Rozdíl $FU_{VZ}-FU_{SL}$ | 18 278 | 37 849 | 74 730 | 110 039 |

| Koncentrace propofolu (µg/ml) | 64 | 96 | 128 | 256 |
|---|---------|---------|---------|---------|
| 1 | 336 368 | 353 463 | 394 303 | 488 896 |
| 2 | 333 361 | 375 905 | 419 249 | 492 001 |
| 3 | 329 984 | 383 095 | 412 439 | 513 217 |
| Průměr (FU) | 333 238 | 370 821 | 408 664 | 498 038 |
| SD | 3 194 | 15 456 | 12 894 | 13 237 |
| RSD (%) | 0,96 | 4,17 | 3,16 | 2,66 |
| Rozdíl FU_{VZ}-FU_{SL} | 135 416 | 172 999 | 210 842 | 300 216 |

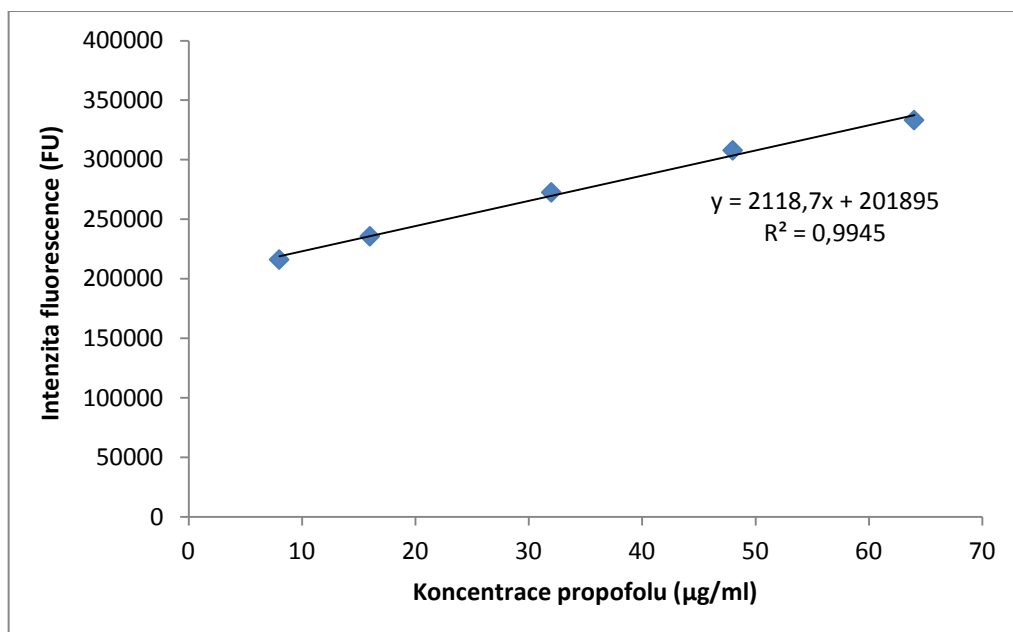


Obrázek 21: Kalibrační závislost

Z Obrázku 21 vyplývá, že závislost intenzity fluorescence není lineární v celém uvedeném rozsahu koncentrací, proto byl hledán takový rozsah koncentrací, ve kterém by závislost lineární byla (Obrázek 22 a 23).



Obrázek 22: Lineární úsek kalibrační závislosti s odečtením signálu slepého roztoku



Obrázek 23: Lineární úsek kalibrační závislosti bez odečtení signálu slepého roztoku

V rozmezí koncentrací 8 až 64 µg/ml již dochází k lineárnímu růstu intenzity fluorescence. Z kalibrační křivky bez odečtení signálu slepého roztoku byl spočítán limit detekce (LOD = 0,83 µg/ml) a limit kvantifikace (LOQ = 7,25 µg/ml).

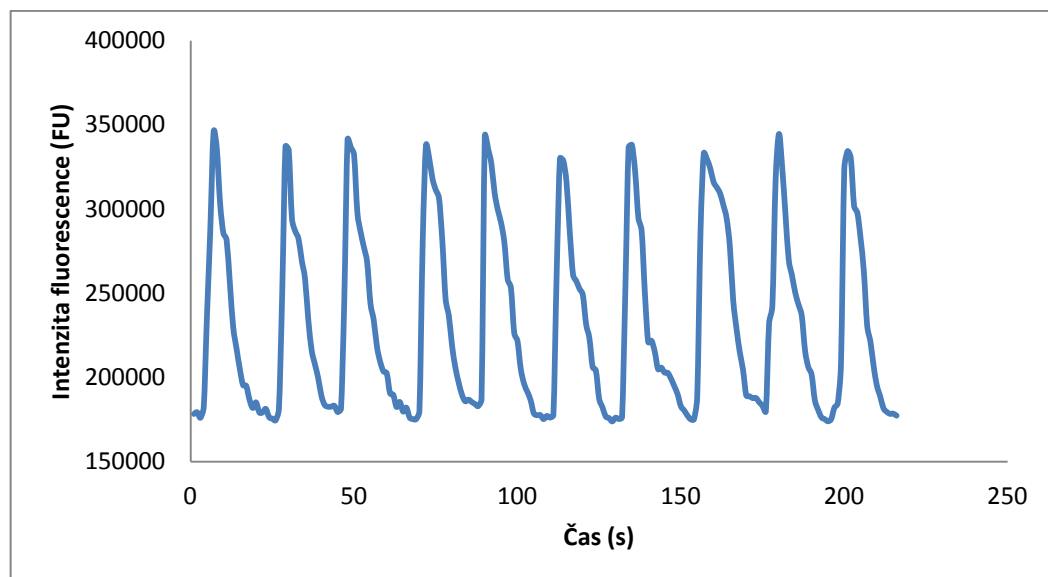
5.4.8. Opakovatelnost

Tabulka 9: Opakovatelnost měření

| Koncentrace propofolu (µg/ml) | 16 | 64 |
|-------------------------------|---------|---------|
| 1 | 229 912 | 345 581 |
| 2 | 230 913 | 337 204 |
| 3 | 229 890 | 341 373 |
| 4 | 233 058 | 337 707 |
| 5 | 233 757 | 343 445 |
| 6 | 229 073 | 330 143 |
| 7 | 224 080 | 338 224 |
| 8 | 225 517 | 333 083 |
| 9 | 223 396 | 344 582 |
| 10 | 228 276 | 334 422 |
| Průměr (FU) | 228 787 | 338 576 |
| SD | 3 531 | 5 142 |
| RSD (%) | 1,54 | 1,52 |

Hodnoty relativních směrodatných odchylek 1,54% pro koncentraci 16 µg/ml a 1,52% pro koncentraci 64µg/ml prokázaly dostatečnou opakovatelnost

měření. Obrázek 24 zobrazuje záznam měření opakovatelnosti při koncentraci 64 $\mu\text{g/ml}$.



Obrázek 24: Záznam měření opakovatelnosti

6. Souhrn

Nejprve byl proveden vizuální výběr extrakčního rozpouštědla pomocí reakce ve zkumavce. Na základě reakce ve zkumavce bylo vybráno i disperzní činidlo, které bylo předem vytipováno v odborném článku [20]. Rovněž bylo zjišťováno, z jaké extrakční jednotky se bude po extrakci nejjednodušší odebrat horní fáze k detekci.

V SIA systému byly poté postupně optimalizovány tyto parametry: způsob mísení, rychlost průtoku detektorem, objem extrakční směsi, objem dávkovaný do detektoru. Nakonec byl studován vliv snížení pH přidáním kyseliny chlorovodíkové.

Kromě uvedených parametrů byly v průběhu měření upravovány i další podmínky, např. rychlost vypouštění extrakční směsi do extrakční jednotky. Největším problémem byl častý výskyt bublin během záznamu fluorescenčního signálu, jenž mohl být způsoben nedokonalým nastavením hadičky aspirující vrchní fázi po extrakci, případně kolísající teplotou v místnosti. Pro zamezení vzniku bublin byly nastavovány různé kroky během analýzy jako promytí zmíněné hadičky malým objemem organické fáze před vlastním odebráním k detekci či promytí detektoru extrakční směsí před detekcí.

Výsledky optimalizace shrnuje Tabulka 10.

Po optimalizaci byla změřena kalibrační závislost, po nalezení její lineární oblasti byly vypočítány limity detekce a kvantifikace. Jako poslední byla proměřena opakovatelnost pro koncentrace 16 a 64 $\mu\text{g/ml}$.

Mezi výhody použité metody patří snadnost provedení, jednoduchost a cena systému a nízká spotřeba organických rozpouštědel. Navíc je metoda poměrně rychlá.

Tabulka 10: Výsledky optimalizace

| Parametr | Výsledek |
|---|-------------------------------|
| Extrakční rozpouštědlo | Amylacetát |
| Disperzní činidlo | Acetonitril |
| Poměr extrakčního rozpouštědla a disperzního činidla | 1:1,5 |
| Extrakční jednotka | Odměrná baňka o objemu 5 ml |
| Způsob mísení extrakční směsi a vzorku | Střídavě v extrakční jednotce |
| Rychlost průtoku detektorem | 25 μ l/s |
| Objem extrakční směsi | 300 μ l |
| Objem dávkovaný do detektoru | 100 μ l |
| Snížení pH | Ne |
| Rychlost vypouštění extrakční směsi do extrakční jednotky | 200 μ l/s |
| Promytí hadičky | Ano |
| Promytí detektoru | Ne |

7. Závěr

Cílem mojí diplomové práce bylo optimalizovat metodu stanovení propofolu s využitím disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny automatizované v systému sekvenční injekční analýzy s fluorescenční detekcí. Po nalezení optimálních parametrů byla proměřena kalibrační křivka. Lineární nárůst fluorescenčního signálu byl zjištěn v rozsahu koncentrací 8 – 64 $\mu\text{g/ml}$ s korelačním koeficientem 0,9945. Hodnota detekčního limitu byla 0,83 $\mu\text{g/ml}$, hodnota kvantifikačního limitu byla 7,25 $\mu\text{g/ml}$. Na závěr byla ověřena opakovatelnost měření, relativní směrodatná odchylka činila 1,54% v případě koncentrace propofolu 16 $\mu\text{g/ml}$ a 1,52% při koncentraci 64 $\mu\text{g/ml}$. Doba jedné analýzy byla 152 s při jednom nástřiku vzorku, hodnota prekoncentračního faktoru, vypočtená jako poměr objemů vodné fáze a extrakčního rozpouštědla, byla 37,5.

8. Seznam literatury

- [1] Růžička, J.: Flow injection, 4th Edition, FIALab Instruments Inc., 2009.
- [2] Paseková H., Polášek M., Solich P.: Sekvenční injekční analýza, Chemické Listy 93 (1999) 354 – 359.
- [3] Barnett N. W., Lenehan C. E., Lewis S. W.: Sequential injection analysis: an alternative approach to process analytical chemistry, Trends in Analytical Chemistry 18 (1999) 346 – 353.
- [4] Škrlíková J., Andruch V., Sklenářová H., Chocholouš P., Solich P., Balogh I. S.: A novel dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA) for automated liquid – liquid extraction. Application for the determination of picric acid, Analytica Chimica Acta 666 (2010) 55 – 61.
- [5] Škrlíková J., Andruch V., Sklenářová H., Chocholouš P., Solich P., Balogh I. S.: An air-assisted liquid – liquid extraction using a dual-valve sequential injection manifold (DV-SIA): Determination of copper, Analytical Methods 2 (2010) 1134 – 1139.
- [6] Chocholouš P., Solich P., Šatínský D.: An overview of sequential injection chromatography, Analytica Chimica Acta 600 (2007) 129 – 135.
- [7] Acebal C. C., Sklenářová H., Škrlíková J., Šrámková I., Andruch V., Balogh I. S., Solich P.: Application of DV-SIA manifold for determination of thiocyanate ions in human saliva samples, Talanta 96 (2012) 107 – 112.
- [8] Brabcová I., Disertační práce: Využití moderních chromatografických přístupů a úprav vzorků v analýze biologicky aktivních látek, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2013.

- [9] Sarafray-Yazdi A., Amiri A.: Liquid-phase microextraction, Trends in Analytical Chemistry 29 (2010) 1 – 14.
- [10] Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C.: Miniaturized preconcentration methods based on liquid – liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, Spectrochimica Acta Part B 64 (2009) 1 – 15.
- [11] Xu L., Basheer Ch., Lee H. K.: Developments in single-drop microextraction, Journal of Chromatography A 1152 (2007) 184 – 192.
- [12] Mahugo-Santana C., Sosa-Ferrera Z., Torres-Padrón E., Santana-Rodríguez J. J.: Application of new approaches to liquid-phase microextraction for determination of emerging pollutants, Trends in Analytical Chemistry 30 (2011) 731 – 748.
- [13] Lee J., Lee H. K., Rasmussen K. E., Pedersen-Bjergaard S.: Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane of liquid - phase microextraction. A review, Analytica Chimica Acta 624 (2008) 253 – 268.
- [14] Rezaee M., Assadi Y., Hosseini M. M., Aghaee E., Ahmadi F., Berijani S.: Determination of organic compounds in water using dispersive liquid – liquid microextraction, Journal of Chromatography A 1116 (2006) 1 – 9.
- [15] Kocúrová L., Balogh I. S., Šandrejová J., Andruch V.: Recent advances in dispersive liquid – liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, Microchemical Journal 102 (2012) 11 – 17.
- [16] Xu H., Ding Z., Lv L., Song D., Feng Y.: A novel dispersive liquid – liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples, Analytica Chimica Acta 636 (2009) 28 – 33.

[17] Anthemidis A. N., Ioannou K. G.: On-line sequential injection dispersive liquid – liquid microextraction system for flame atomic absorption spectrometric determination of copper and lead in water samples, *Talanta* 79 (2009) 86 – 91.

[18] Anthemidis A. N., Ioannou K. G.: Development of sequential injection dispersive liquid – liquid microextraction system for electrothermal atomic absorption spectrometry by using a hydrophobic sorbent material: Determination of lead and cadmium in natural waters, *Analytica Chimica Acta* 668 (2010) 35 – 40.

[19] Anthemidis A. N., Ioannou K. G.: Sequential injection dispersive liquid – liquid microextraction based on fatty alcohols and poly(etheretherketone)-turnings for metal determination by flame atomic absorption spectrometry, *Talanta* 84 (2011) 1215 – 1220.

[20] Andruch V., Acebal C. C., Škrliková J., Sklenářová H., Solich P., Balogh I. S., Billes F., Kocúrová L.: Automated on-line dispersive liquid – liquid microextraction based on a sequential injection system, *Microchemical Journal* 100 (2012), 77 – 82.

[21] Němcová I., Čermáková L., Rychlovský P.: *Spektrometrické analytické metody I.*, Karolinum, 1997.

[22] Trojanowicz M.: *Flow injection analysis: instrumentation and applications*, World Scientific, Singapore 2000.

[23] Fährnich J.: Fluorimetrie [online]. [cit. 2014 - 3 - 27] Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/FLUORO.pdf>

[24] Molecular fluorescence spectroscopy [online]. [cit. 2014 - 3 - 27] Dostupné z: <http://www.monzipal.net/Lab%20Manuals/Practical%20Instrumental%20Analysis/Instrument%20Book/Instbook/Fluorescence.htm>

- [25] Fluorescens [online]. [cit. 2014 - 3 - 27] Dostupné z:
<https://medtekipedia.wikispaces.com/Fluorescens>
- [26] Klouda P.: Moderní analytické metody, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003.
- [27] Larsen R.: Anestezie, Grada, 2004.
- [28] Katzung B. G.: Basic and clinical pharmacology, McGraw-Hill, 2004.
- [29] Harvey R. A., Clark M. A., Finkel R., Rey J. A., Whalen K.: Pharmacology, Wolters Kluwer, 2011.
- [30] Český lékopis 2009, 3. díl, 3016 – 3017, Grada Publishing a.s., Praha 2009.
- [31] Vzorec propofolu [online]. [cit. 2014 - 4 - 11] Dostupné z:
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/w505102?lang=en®ion=CZ>
- [32] Pickl K. E., Adamek V., Gorges R., Sinner F. M.: Headspace-SPME-GC/MS as a simple cleanup tool for sensitive 2,6-diisopropylphenol analysis from lipid emulsions and adaptable to other matrices, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 55 (2011) 1231 – 1236.
- [33] Yeganeh M. H., Ramzan I.: Determination of propofol in rat whole blood and plasma by high-performance liquid chromatography, Journal of Chromatography B 691 (1997) 478 – 482.
- [34] Grossherr M., Hengstenberg A., Papenberg H., Dibbelt L., Wollenberg B., Schmucker P., Gehring H., Meier T.: Propofol in bronchoalveolar lavage during anaesthesia, Clinica Chimica Acta 412 (2011) 190 – 193.

[35] Beaudry F., Guénette S. A., Winterborn A., Marier J. F., Vachon P.: Development of a rapid and sensitive LC – ESI/MS/MS assay for the quantification of propofol using a simple off-line dansyl chloride derivatization reaction to enhance signal intensity, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 39 (2005) 411 – 417.

[36] Guitton J., Desage M., Lepape A., Degoute C. S., Manchon M., Brazier J. L.: Quantitation of propofol in whole blood by gas chromatography – mass spectrometry, *Journal of Chromatography* 669 (1995) 358 – 365.

[37] Miekisch W., Fuchs P., Kamysek S., Neumann C., Schubert J. K.: Assessment of propofol concentration in human breath and blood by means of HS-SPME-GC – MS, *Clinica Chimica Acta* 395 (2008) 32 – 37.

[38] Mikrozumavka Eppendorf [online]. [cit. 2014 - 4 - 15] Dostupné z: <http://www.bdl-cee.com/mikrozumavka-eppendorf-3810-x>

[39] Volac volumetric flask [online]. [cit. 2014 - 4 - 11] Dostupné z: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/z306339?lang=en®ion=CZ>

[40] Šimura J., Diplomová práce: Stanovení pefloxacinu technikou sekvenční injekční analýzy s chemiluminiscenční detekcí, Katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta, Univerzita Karlova, Hradec Králové 2012.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Schéma systému SIA

Obrázek 2: Změna směru toku při SIA

Obrázek 3: SIA – LOV

Obrázek 4: Schéma systému SIC

Obrázek 5: Princip DI-SDME

Obrázek 6: Princip HS-SDME

Obrázek 7: Princip (a) třífázové a (b) dvoufázové HF-LPME

Obrázek 8: Schematické znázornění DLLME

Obrázek 9: Automatizace DLLME v SIA systému s využitím A) mikrokolony a B) pomocného rozpouštědla

Obrázek 10: Přechody mezi elektronově vibračními stavy v molekule

Obrázek 11: Schéma jednopaprskového spektrofluorimetru

Obrázek 12: Vzorec propofolu

Obrázek 13: Mikrozkušavka

Obrázek 14: Odměrná baňka

Obrázek 15: Schéma systému

Obrázek 16: Závislost intenzity fluorescence na způsobu mísení

Obrázek 17: Závislost intenzity fluorescence na rychlosti průtoku detektorem

Obrázek 18: Závislost intenzity fluorescence na objemu extrakční směsi

Obrázek 19: Závislost intenzity fluorescence na objemu dávkovaného do detektoru

Obrázek 20: Závislost intenzity fluorescence na úpravě pH

Obrázek 21: Kalibrační závislost

Obrázek 22: Lineární úsek kalibrační závislosti s odečtením signálu slepého roztoku

Obrázek 23: Lineární úsek kalibrační závislosti bez odečtení signálu slepého roztoku

Obrázek 24: Záznam měření opakovatelnosti

Seznam tabulek

Tabulka 1: Příprava kalibračních roztoků

Tabulka 2: Optimalizace způsobu mísení

Tabulka 3: Optimalizace rychlosti průtoku detektorem

Tabulka 4: Optimalizace objemu extrakční směsi

Tabulka 5: Optimalizace objemu dávkovaného do detektoru

Tabulka 6: Závislost intenzity fluorescence na úpravě pH

Tabulka 7: Slepý roztok

Tabulka 8: Kalibrační závislost

Tabulka 9: Opakovatelnost měření

Tabulka 10: Výsledky optimalizace