

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

**Automatizace extrakčního postupu pro citlivé stanovení
propranololu v matrici povrchové vody**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Warunya Boonjob, Ph.D.

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

Hradec Králové 2016

Kateřina Muffová

Prohlašuji, že tato práce je moje původní autorské dílo. Veškerá literatura a další zdroje, z kterých jsem čerpala, jsou uvedené v seznamu použité literatury a jsou řádně ocitované. Práce nebyla použita k získání jiného titulu.

V Hradci Králové:

Chtěla bych touto cestou poděkovat vedoucí mé diplomové práce Warunyi Boonjob, Ph.D. a konzultantce Doc. PharmDr. Haně Sklenářové, Ph.D. za jejich rady, ochotné jednání a trpělivost. Také děkuji mé rodině za podporu ve studiu.

Abstrakt

Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Kateřina Muffová

Školitel: Warunya Boonjob, Ph.D.

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

Název diplomové práce: Automatizace extrakčního postupu pro citlivé stanovení propranololu v matrici povrchové vody

Tato práce se zabývá vývojem metody pro automatizaci extrakčního postupu citlivého stanovení propranololu v matrici povrchové vody. Analyt byl zakoncentrován na sorbentu Oasis - HLB a jako eluční činidlo byl použit čistý methanol. Detekce byla provedena pomocí UV spektrofotometrie při 220 nm. Byly nalezeny optimální podmínky pro automatizaci v systému sekvenční injekční analýzy (SIA). Byly optimalizovány: způsob využití sorbentu v průtokovém systému, objem vzorku, objem elučního rozpouštědla a průtoková rychlost detekce. Byla proměřena kalibrační závislost pro propranolol v destilované vodě s koeficientem determinace 0,9921 v rozmezí 0,5 ppm až 4 ppm a vypočítán limit detekce (LOD = 0,442 ppm) a limit kvantifikace (LOQ = 1,473 ppm). Byla stanovena přesnost pro koncentraci 1 ppm s relativní směrodatnou odchylkou 2,51 %. Byla proměřena matricová kalibrace propranololu v povrchové vodě v rozmezí 0,5 ppm až 4 ppm. Determinační koeficient byl 0,9901, limit detekce (LOD = 0,496 ppm) a limit kvantifikace (LOQ = 1,653 ppm), koeficient zakoncentrování byl 8,98 a výtěžnost činila 89,81 %.

Abstract

Charles University in Prague

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical chemistry

Candidate: Kateřina Muffová

Supervisor: Warunya Boonjob, Ph.D.

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

Title of diploma work: Automation of extraction procedure for sensitive determination of propranolol in surface water matrix

This work deals with the development of the method for automation of the extraction process for sensitive determination of propranolol in a matrix of surface water. The analyte was pre-concentrated on the sorbent Oasis - HLB and pure methanol was used as eluent. Detection was performed by UV spectrophotometry at 220 nm. The optimum conditions for automation of determination in sequential injection analysis (SIA) system were found with respect to: way how sorbent was applied in the flow system, sample volume, the volume of the eluting solvent and a flow rate of detection. Calibration curve for propranolol in distilled water was tested with a determination coefficient of 0.9921 in the range of 0.5 ppm - 4 ppm and the calculated limit of detection (LOD = 0.442 ppm) and the limit of quantification (LOQ = 1.473 ppm). Precision was determined for a concentration of 1 ppm with a relative standard deviation of 2.51%. Matrix calibration of propranolol in surface water in the range from 0.5 ppm to 4 ppm was measured. The determination coefficient was 0.9901, the limit of detection (LOD = 0.496) and the limit of quantification (LOQ = 1,653 ppm) were evaluated and pre-concentration coefficient was 8.98. The recovery of the propranolol determination in surface water was 89.81 %.

Obsah

Abstrakt.....	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	9
1. Úvod.....	11
2. Cíl a popis zadání.....	12
3. Teoretická část.....	13
3.1. Extrakce na tuhou fázi (SPE).....	13
3.1.1. Princip metody.....	13
3.1.2. Sorbenty.....	13
3.1.2.1. Oasis HLB.....	14
3.1.2.2. Molekulárně vtištěné polymery (MIPs).....	15
3.1.2.3. Materiály s omezeným přístupem (RAM).....	15
3.2. Sekvenční injekční analýza.....	16
3.2.1. Lab-on-valve uspořádání.....	18
3.2.2. Automatizace SPE v SIA-LOV systému.....	19
3.3. Propranolol.....	20
3.3.1. Metody stanovení propranololu – rešerše odborné literatury.....	21
4. Experimentální část.....	25
4.1. Materiál.....	25
4.1.1. Chemikálie.....	25
4.1.2. Technické vybavení a software.....	25

4.2. Pracovní postup.....	26
4.2.1. Příprava roztoků.....	26
4.2.1.1. Zásobní roztoky.....	26
4.2.1.2. Kalibrační roztoky.....	26
4.2.2. Výběr postupu využití SPE sorbentu.....	27
4.2.3. Optimalizace systému.....	27
4.2.3.1. Optimalizace doby adsorpce a naplnění sorbentu do průtokového systému.....	28
4.2.3.2. Optimalizace objemu vzorku.....	28
4.2.3.3. Optimalizace objemu eluč. rozpouštědla pro detekci....	29
4.2.3.4. Optimalizace průtokové rychlosti detekce.....	29
4.3. Vybrané validační parametry.....	30
4.3.1. Lineární rozsah, LOD, LOQ.....	30
4.3.2. Přesnost.....	30
4.4. Analýzy reálné matrice.....	31
5. Výsledky a diskuze.....	32
5.1. Výběr postupu využití sorbentu.....	32
5.1.1. Zpracování sorbentu mimo průtokový systém.....	32
5.2. Optimalizace systému.....	33
5.2.1. Optimalizace tvorby kolonky.....	33
5.2.2. Optimalizace doby adsorpce analytu na SPE.....	33
5.2.3. Optimalizace objemu sorbentu.....	35
5.2.4. Optimalizace objemu rozpouštědla pro detekci.....	36

5.2.5. Optimalizace průtokové rychlosti detekce.....	38
5.3. Výsledný program.....	41
5.4. Přesnost.....	44
5.5. Hodnocení linearity v destilované vodě.....	45
5.6. Analýza reálné matrice.....	47
5.6.1. Analýza reálné matrice – vodovodní voda.....	47
5.6.2. Analýza reálné matrice – povrchová voda.....	48
6. Souhrn.....	50
7. Závěr.....	51
8. Seznam literatury.....	52
Seznam tabulek.....	55
Seznam obrázků.....	56

Seznam zkratek

A	absorbance
ELISA	imunologická metoda k detekci protilátek (enzyme-linked immuno sorbent assay)
FIA	průtoková injekční analýza (flow injection analysis)
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (gas chromatography-mass spectrometry)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (liquid chromatography-mass spectrometry)
LC-ESI-MS-MS	kapalinová chromatografie-elektrosprejová ionizace-hmotnostní spektrometrie (tandemová detekce)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
LOV	lab-on-valve uspořádání
MIP	molekulárně vtištěné polymery (molecular imprinted polymers)
MSFIA	průtoková injekční analýza v systému s několika písty (multisyringe flow injection analysis)
RAM	materiál s omezeným přístupem (restricted acces material)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)

SIA	sekvenční injekční analýza (sequential injection analysis)
SPE	extrakce na tuhé fázi (solid phase extraction)
STD	standard
UV	ultrafialové záření (ultraviolet radiation)
VIS	viditelné záření (visible radiation)
μSI LOV	mikro sekvenční injekční analýza v lab-on-valve uspořádání

1. Úvod

Sekvenční injekční analýza (SIA) je jednou z průtokových metod, která vznikla při odstraňování nevýhod průtokové injekční analýzy (FIA). Ve srovnání s průtokovou injekční analýzou je sekvenční injekční analýza efektivnější při manipulaci s jednotlivými roztoky a je zde možnost plné automatizace celé řady extrakčních kroků. Je vhodná pro stanovení velkého počtu vzorků nejen většiny běžných anorganických iontů a organických látek, ale má velký význam i ve farmacii pro stanovení léčiv v tělních tekutinách, odpadních a povrchových vodách a může se uplatnit také při kontrole kvality a účinnosti léčivých přípravků.

Vzhledem k tomu, že spotřeba léčiv celosvětově stoupá a jejich rezidua znečišťují životní prostředí, byla práce zaměřena na automatické stanovení propranololu s využitím extrakce na tuhou fázi v matrici povrchové vody. Propranolol patří do skupiny neselektivních betablokátorů bez vnitřní sympatomimetické aktivity, který se používá jako antihypertenzivum, při léčbě anginy pectoris, tachyarytmií a infarktu myokardu. Jeho spotřeba je relativně vysoká a proto je vhodné monitorovat jeho obsah ve zmíněném typu matrice vzorku.

2. Cíl a popis zadání

Cílem této diplomové práce bylo automatizovat extrakční postup pro citlivé stanovení propranololu v matrici povrchové vody s využitím extrakce na tuhou fázi v systému sekvenční injekční analýzy (SIA) s UV detekcí. Úkolem bylo vybrat optimální použití sorbentu, optimalizovat parametry měření (tvorbu extrakční kolonky, objem vzorku, objem elučního rozpouštědla pro detekci a průtokovou rychlost detekce), poté změřit kalibrační závislost propranololu v destilované vodě, vypočítat limit detekce a kvantifikace a ověřit přesnost. U vzorku ve vodovodní vodě bylo třeba stanovit výtěžnost a koeficient zakoncentrování. Dalším úkolem bylo proměřit matricovou kalibraci v povrchové vodě a opět vypočítat limit detekce a kvantifikace.

3. Teoretická část

3.1. Extrakce na tuhou fázi (SPE)

3.1.1. Princip metody

Extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction, SPE) je velmi často užívaná metoda přípravy vzorku. SPE technika oproti extrakci kapalina/kapalina zabraňuje mnoha problémům spojeným s neúplnou separací fází, použitím velkého množství organických rozpouštědel, jejich likvidací a dalších. SPE je efektivnější, rychlejší a může být plně automatizována. Její podstatou je zadržení/adsorpce molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká zkoušený vzorek. Principem je to, že analyt vytváří silnější interakce s pevnou fází než s kapalnou fází, ve které je rozpuštěn. Nežádoucí příměsi mohou být odstraněny promytím různými rozpouštědly a v konečné fázi je analyt vhodným elučním rozpouštědlem vymyt do detektoru [1, 2].

3.1.2. Sorbenty

Sorbent bývá uložen v zásobnících (kartridžích) z polypropylenu, skla nebo slisován se skleněnými vlákny do disků.

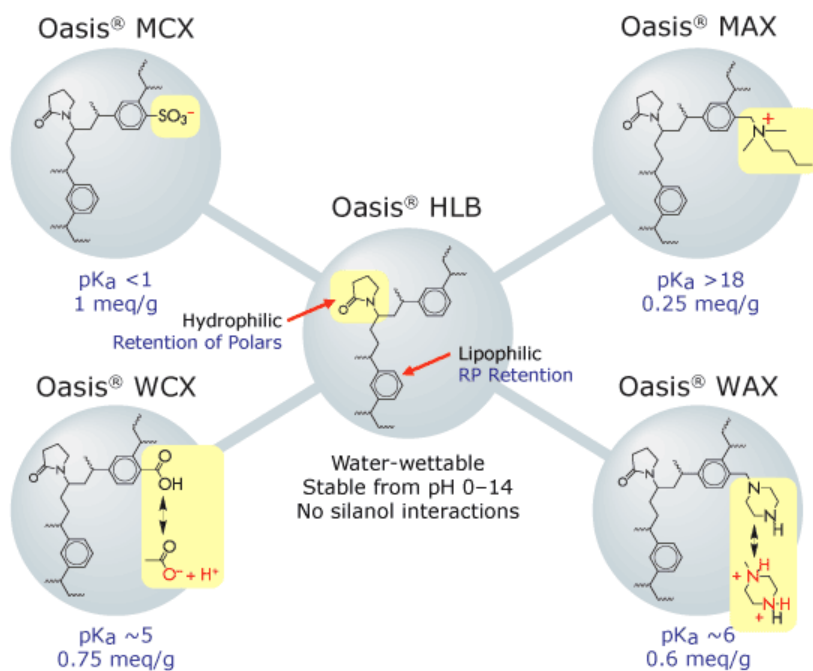


Obrázek č. 1 : Uložení sorbentu [3]

Sorbenty bývají podobného složení jako stacionární fáze při kapalinové chromatografii. Nejvíce jsou používány reverzní fáze na bázi silikagelu. Při interakci dochází k navázání skupin analytu na povrchové skupiny sorbentu, a proto je velmi důležité znát vlastnosti matrice a analytu, aby mohlo dojít k žádoucímu navázání/adsorpci analytu. Analyty jsou aplikovány ve fázi kapalné (v roztoku) a jsou zadržovány na pevném sorbentu pomocí van der Waalsových sil, vodíkových vazeb, interakcí dipól – dipól a iontových interakcí typu elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty. Lze pracovat při vyšším i nízkém tlaku a vyšších průtokových rychlostech díky tomu, že sorbent je zrnitý a velikost jeho částic je v porovnání se stacionárními fázemi v HPLC větší [4]. Dále budou krátce popsány vlastnosti použitého sorbentu (Oasis HLB) a dalších dvou typů, které se využívají pro vysoce selektivní SPE extrakci (MIP a RAM).

3.1.2.1. Oasis HLB

Oasis HLB je univerzální, silně hydrofilní, ve vodě smáčitelný polymer, který se vyznačuje jedinečnou hydrofilně - lipofilní rovnováhou. Udržuje si svou vysokou retenční schopnost a kapacitu i po úplném vyschnutí. Používá se pro zakoncentrování kyselých, bazických i neutrálních analytů. Jeho výhodou jsou: optimální citlivost pro malé molekuly a peptidy, snížení efektu matrice vzorku a poměrně vysoká selektivita. Sorbent Oasis se vyrábí v pěti různých typech, viz. Obrázek č. 2 [5, 6].



Obrázek č. 2 : Typy sorbentu Oasis [7]

3.1.2.2. Molekulárně vtištěné polymery (MIPs)

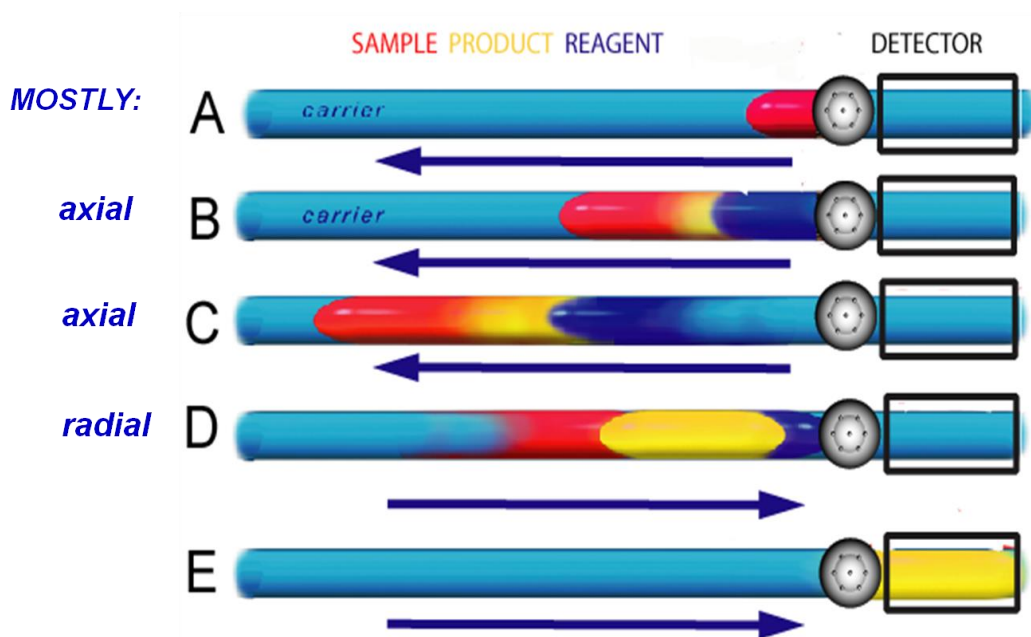
SPE kolony, které jsou plněné polymery MIP (molecularly imprinted polymers) se používají pro selektivní extrakce určité látky nebo skupiny strukturních analogů ze složitých matric. Jsou to vysoce zesíťované polymerní fáze s póry chemicky a stericky komplementárními k molekule analytu. Vysoká retence analytu je zajištěna nekovalentními interakcemi mezi analytem a sorbentem. Příkladem tohoto sorbentu je SupelMIP, který může velmi efektivně zakoncentrovat analyt ze vzorku a je tak dosaženo selektivní extrakce a nižšího limitu detekce. Je stabilní v celém rozsahu pH, vhodný pro LC-MS stanovení [8].

3.1.2.3. Materiály s omezeným přístupem (RAM)

RAM (restricted acces materials) jsou materiály, které umožní přímé dávkování biologických vzorků, protože místa pro interakci uvnitř pórů jsou přístupná pro malé molekuly a dojde tak k retenci analytu podle typu sorbentu. Makromolekuly interagují pouze s vnějším povrchem částic a nedochází k jejich adsorpci a retenci [9].

3.2. Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis, SIA) se řadí mezi průtokové analytické metody. Principem metody je postupné aspirování nosného proudu (carrier), vzorku a činidla do jednobanálního systému za pomoci vícecestného selekčního ventilu a pístového čerpadla. Poté se směr pohybu pístu změni na opačný, dojde tak k promísení zóny vzorku a činidla a vzniklý produkt je následně dopraven do detektoru. Výsledným analytickým signálem je pík, což je záznam změny koncentračního gradientu reakčního produktu při průchodu detektorem. U sekvenční injekční analýzy je využívána změna přímého a zpětného toku a tím je dosaženo snazší přeměny analytu na výsledný produkt [4].



Obrázek č. 4 : Princip metody SIA [14]

carrier – nosný proud

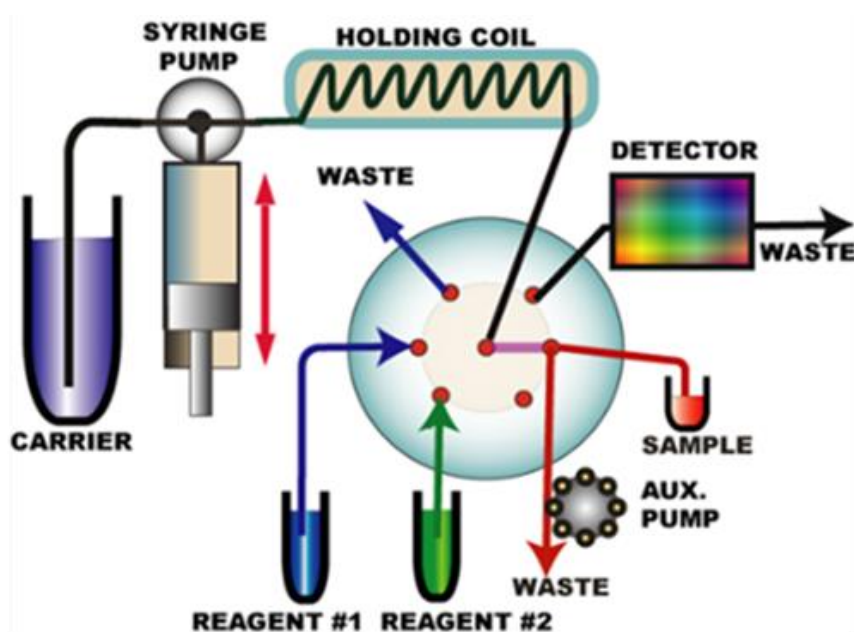
červená zóna – vzorek

žlutá zóna – produkt

modrá zóna – činidlo

detector – detektor

Základní konfigurace SIA systému se skládá z vícecestného selekčního ventilu, který je centrálním portem spojen s dvousměrným pístovým čerpadlem, které aspiruje přesně určené množství vzorku nebo činidla do mísící cívky. Jako spojovací materiál jsou nejčastěji použity teflonové hadičky. Na konci celého systému nesmí chybět detektor, který odečítá měřený signál a přenáší naměřená data ke zpracování do počítače, ve kterém pracuje program určený k řízení jednotlivých kroků měřicího cyklu, ale také ke zpracování dat. Celý systém pracuje v naprogramovaných cyklech řídících pohyb pístu čerpadla, který musí být synchronizován s přepínáním pozic selekčního ventilu. Je nutné, aby vše probíhalo synchronizovaně a mohlo tak být dosaženo reprodukovatelné disperze jednotlivých zón v SIA systému. Pokud jsou všechny podmínky dodrženy, je tak získána i reprodukovatelná (opakovatelná) odpověď detektoru na procházející zónu měřeného produktu/analytu [13].



Obrázek č. 5 : Základní schéma SIA [14]

carrier – nosič	syringe pump – pístové čerpadlo	detector – detektor
waste – odpad	holding coil – mísící cívka	reagent – reakční činidlo
sample – vzorek	aux. pump – pomocné čerpadlo	

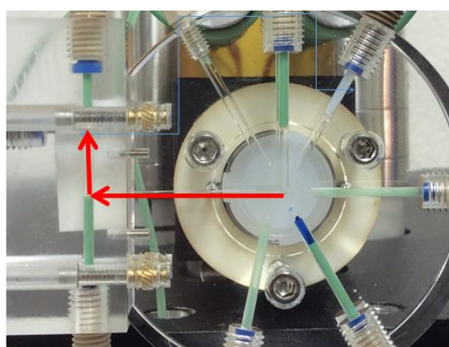
3.2.1. Lab-on-valve uspořádání

Lab-on-valve (LOV) je analytická technika, která navazuje na systémy FIA a SIA. Protože k analýzám je často potřeba drahých nebo toxických činidel, byl vyvinut tento miniaturizovaný systém (μ SI LOV). Podařilo se tak snížit spotřeba reagentů a získat tak bezpečnou, rychlejší a ekonomicky méně nákladnou metodu.

Základní strukturou je jednoduchý nástavec umístěný na selekčním ventilu. Název lab-on-valve v překladu znamená laboratoř na ventilu. Celý systém je sestaven tak, aby byla vzdálenost mezi nástřikem vzorku a detektorem co možná nejkratší. V LOV modulu jsou obsaženy jednotlivé komponenty jako průtoková cela, jednotlivé porty, konektory, optická vlákna. Centrální port nástavce je spojen mísící cívkou s pístovou pumpou. Za pomoci vnitřního rotoru v selekčním ventilu se centrální port otáčí k jednotlivým portům LOV jednotky. Dochází tak k propojení portu s pumpou a je možné provést manipulaci s jednotlivými roztoky [15, 16].

Hlavními výhodami LOV uspořádání je univerzálnost a jednoduchost, jakou se dá přizpůsobit dané analýze. Podařilo se snížit objem vzorku, spotřebu reagentů a získat tak bezpečnou, rychlejší a ekonomicky méně nákladnou metodu [17]. Objem vzorku potřebný pro analýzu se pohybuje v rozmezí od 10 do 20 μ l a chemický odpad činí 0,1 – 0,2 ml [18].

Nejčastěji využívanou metodou detekce je spektrofotometrie nebo fluorescence. Další možné detektory jsou chemiluminiscenční, amperometrické nebo konduktometrické [17].



Obrázek č. 6 : Uspořádání LOV systému [16]

3.2.2. Automatizace SPE v SIA-LOV systému

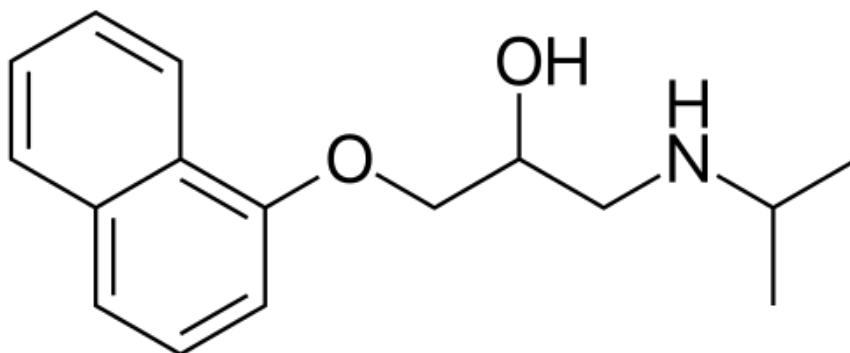
Aby bylo dosaženo co nejlepších výsledků analýzy, je třeba zvýšit citlivost a selektivitu používaných metod. Toho je dosahováno pomocí velmi propracovaného a složitého přístrojového vybavení pro detekci, které je často velmi drahé. Používají se např. metody hmotnostní spektrometrie nebo atomová/emisní spektrometrie. Citlivost a selektivita často není ani za použití těchto přístrojů dostačující a tak lze použít on-line extrakci na tuhé fázi automatizovanou v průtokových systémech, kde je za přesně určených podmínek a časování zlepšena reprodukovatelnost a opakovatelnost analýzy.

Extrakce na tuhou fázi může být provedena dvěma způsoby. Mohou být použity kolonky pro opakované použití, u kterých dochází k obnově aktivního povrchu nebo obnovitelné kolonky, u kterých dochází k obnově částic sorbentu.

Znovupoužitelné kolonky jsou využívány při extrakčním procesu, který se skládá z těchto fází: aktivace sorbentu, kondicionace sorbentu, perfuze vzorku přes tuhou fázi, odstranění balastních látek z matrice, eluci analytu, detekci a promytí kolonky před dalším měřicím cyklem. Znovupoužitelné kolonky jsou vysoce odolné a mohou být použity až stokrát. Dle objemu vzorku je zvoleno množství použitého sorbentu. Používanými sorbenty jsou například ve vodě smáčitelné polymery s hydrofilně-lipofilní rovnováhou, iontovýměnné sorbenty, zesítené formy polymerního polysacharidu agarosy a další. Nevýhodou znovupoužitelných kolonek je zvyšující se tlak v systému a možná kontaminace mezi po sobě následujícími analýzami.

Zadržováním pevných částic SPE sorbentů, které slouží k zakoncentrování analytů ze složitých matric vzorků (bead injection technika) lze u průtokového systému zvýšit univerzálnost jeho použití. Částice tvoří uvnitř systému pevný povrch, na který se může zkoumaný analyt adsorbovat, a také na nich může probíhat chemická reakce mezi analytem a činidly. Poté proběhne detekce analytu v eluátu procházejícím průtokovou celou detektoru. Při použití obnovitelné kolonky nejsou potřeba promývací kroky, protože pro jednotlivé analýzy je použit nový sorbent. Detekce na tuhé fázi může dále zvyšovat citlivost stanovení. Všechny tuhé částice musí být transportovány k místu detekce, aby nedošlo ke ztrátám analytu. Sorbentem může být agaróza, sepharóza a sephadex, na jejichž povrchu mohou být navázány různé molekuly s afinitou ke konkrétním analytům[19,20].

3.3. Propranolol



Obrázek č. 3 : Vzorec propranololu [10]

Sumární vzorec:	C ₁₆ H ₂₂ ClNO ₂
Chemický název:	(2 <i>RS</i>)-1-(isopropylamino)-3-(naftalen-1-yloxy)propan-2-ol-hydrochlorid
Molekulová hmotnost:	295,81
CAS:	318-98-9
Obsah:	99,0 % až 101,0 % počítáno na vysušenou látku
Fyzikální a chemické vlastnosti:	Bílý nebo téměř bílý prášek, který je dobře rozpustný ve vodě a v ethanolu 96% [11]

Vyskytuje se ve formě propranolol – hydrochlorid. Je to nejstarší, hydrofobní neselektivní betablokátor bez vnitřní sympatomimetické aktivity. Jeho biologický poločas je krátký (3-6 hodin). Metabolizuje se v játrech a jeho biologická dostupnost je asi 20–50 %. Používá se při léčbě hypertenze, tachyarytmií, supraventrikulární arytmie, tremoru, úzkostných stavů a při profylaxi migrény. V České republice není registrovaný žádný hromadně vyráběný léčivý přípravek s jeho obsahem, ale substance je využívána v individuálně připravovaných léčivech a to především v pediatrii pro léčbu infantilních hemangiomů. Mezi nejčastější nežádoucí účinky propranololu se řadí bradykardie, bronchospasmus, hypoglykémie, únava, ospalost a chladné končetiny [12].

3.3.1. Metody stanovení propranololu – řešerše odborné literatury

V odborné literatuře bylo nalezeno několik experimentálních metod, jak je možné zakoncentrovat a stanovit propranolol, respektive všechny betablokátory v různých matricích jako je odpadní či povrchová voda nebo biologický materiál (moč). Cílem této části diplomové práce je zmínit několik možností používaných metod a jejich výsledky.

1. První odborný článek se zabývá vývojem vysoce citlivé metody pro simultánní stanovení jedenácti betablokátorů (také propranololu) a betasympatomimetik v odpadní vodě za použití metody LC-ESI-MS-MS. Pro SPE byly použity sorbenty Oasis MCX a Clean Screen (hydrofobní, kationvýměnný sorbent). Jako mobilní fáze byla použita alkalická směs dichlormethan-propanol. Průměrná výtěžnost SPE kroku byla 77,2 - 97,3 %. Limit detekce a kvantifikace byl 0,11 – 6,74 pg/ml, respektive 0,14 – 22,88 pg/ml. Bylo zjištěno, že ani po šesti dnech skladování vzorku při 4 °C nedošlo k degradaci sledovaných léčiv. Vyvinutá metoda byla použita pro stanovení reziduí léčiv v odpadních vodách v Al-Ain a Abu Dhabi (Spojené arabské emiráty). Výsledky ukazují, že procesy čištění odpadních vod nestačí k degradaci těchto sloučenin. Koncentrace betablokátorů v odpadních vodách byla detekována v rozmezí 3,44 – 19,05 pg/ml. Nejvyšší koncentrace byla naměřena u atenololu (125,60 – 234,28 pg/ml) [21].
2. Další výzkumná práce se zaměřuje na přímé stanovení betablokátorů v moči. Metoda využívá sedm různých druhů sorbentů a to: Oasis HLB, Oasis MAX, Oasis MCX, Bond Elute Plexa, Bond Elute Plexa PAX, Bond Elute Plexa PCX a SupelMIP sorbent. Jako nejvhodnější (nejselektivnější) sorbent pro analýzu moči byl vybrán SupelMIP sorbent, který využívá principu molekulárně vtištěných polymerů (MIP). Proměřená kalibrační křivka v rozmezí hodnot od 10 do 1000 ng/ml vykazovala velmi dobrou linearitu ($R^2 > 0,9991$). Limit detekce a kvantifikace byly v rozmezí 0,6 – 2,0 ng/ml a 2,0 – 6,7 ng/ml, RSD v rozmezí od 2 % do 4 %. Metoda může být plně využita např. při dopingových testech u sportovců [22].

3. Další odborný článek se zabývá stanovením atenololu a propranololu v lidské plazmě metodou MSFIA (multisyringe flow injection analysis) s GC – MS detekcí. Proces měření byl limitován zpětným tlakem, takže jako maximální průtoková rychlost byla zvolena rychlost 0,6 ml/min. Jako optimální objem vzorku bylo zvoleno 200 μ l. Determinační koeficient byl při všech měřeních větší než 0,9982. Opakovatelnost metody byla vyjádřena jako variační koeficient, jehož hodnota u všech testovaných hodnot nebyla vyšší než 3,85 %. Limit detekce a kvantifikace byl stanoven na 2 ng/ml a 6 ng/ml. Metoda je velmi účinná a rychlá. Analyzováno může být až 7 vzorků za hodinu [23].

4. Výzkumem detekce metabolitů betablokátorů (metoprololu, bisoprololu a propranololu) se zabývá i další studie. Potřebné metabolity byly získány po inkubaci betablokátorů s frakcí S9 z krysích jater. Pro experimentální stanovení bylo použito metody LC–MS/MS. Je to první navržená metoda biotransformace při použití LC–MS/MS analýzy metabolitů kardiovaskulárních léčiv v odpadních vodách. Jako sorbent byl použit Oasis HLB. Při inkubaci s S9 frakcí bylo po hodině téměř 40 % propranololu metabolizováno a po 4 hodinách byla koncentrace pod hodnotou limitu detekce. Determinační koeficient R^2 byl stanoven na 0,994. Pro určení LOD betablokátorů v odpadních vodách byly použity komerčně dostupné metabolity. Výsledné hodnoty jsou pro propranolol (LOD = 0,1 – 0,3 ng/l), bisoprolol (LOD = 0,01 – 0,06 ng/l) a metoprolol (LOD = 0,02 ng/l) [24].

5. Jako další velmi citlivá, přesná a vysoce selektivní metoda se ukázala metoda stanovení propranololu a 4 – hydroxy propranololu v lidské plazmě. Tato metoda byla optimalizována a validována. Analyty jsou extrahovány z 0,3 ml lidské plazmy za pomoci SPE (v porovnání s kapalnou fází jednodušší, účinnější a snadno automatizovatelný postup) a detekovány za pomoci LC/ESI–MS/MS. Limit kvantifikace byl pro obě látky 0,2 ng/ml, limit detekce pro propranolol 50 pg/ml a pro 4- hydroxypropranolol 100 pg/ml. Kalibrační křivka byla pro propranolol lineární s determinačním koeficientem větším než 0,99 v rozmezí od 0,20 – 135,00 ng/ml [25].

6. Byl nalezen i odborný článek, který porovnává tři analytické techniky (ELISA, GC–MS a LC–MS) pro analýzu 16-ti betablokátorů (součástí je i propranolol). Byla optimalizována metoda přípravy vzorku pro každou analytickou techniku z malého množství moči (1-2,5 ml). Byly posuzovány možnosti a citlivost jednotlivých technik pro aplikaci při dopingových testech. ELISA, jejíž selektivita je velmi špatná a citlivost nejnižší, je využívána jako rychlý screeningový test. GC-MS a LC-MS poté mohou identifikovat a kvantifikovat betablokatory, protože vykazují dobrou citlivost a přesnost stanovení. LC-MS technika umožní stanovení v rozmezí 0,53 až 2,23 ng/ml [26].

V této části diplomové práce bylo zmíněno několik metod stanovení hladin léčiv (především propranololu) v různých matricích. Bylo objeveno mnoho dalších odborných článků, ale zde je uvedeno pouze několik. Při porovnání uvedených metod bylo zjištěno, že při stanovení betablokátorů jsou hojně užívány průtokové metody (LC, MSFIA) a plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem, UV spektrofotometrem a dalšími. Pro stanovení může být vzorek betablokátorů, ale i jejich metabolitů, součástí matrice plazmy, moči, povrchových i odpadních vod. Objemy vzorků pro stanovení obsahu léčiva se vyvíjením modernějších metod stále snižují. Pro analýzu z plazmy je zapotřebí pouze 0,3 ml a moči 1 ml. Metody stanovení jsou také stále rychlejší. Při MSFIA analýze lidské plazmy může být stanoveno až 7 vzorků za hodinu. Vývojem metod je možné v matrici detekovat stále nižší koncentrace chemických látek. Souhrn vybraných informací z odborných článků je v Tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 : Shrnutí výsledků citovaných odborných článků

Analytická metoda	Použitý sorbent	Determinační koeficient	LOD	LOQ	Poznámka	Článek
LC-ESI-MS/MS	Oasis MCX,Clean Screen	-	0,11-6,74 pg/ml	0,14-22,88 pg/ml	Výtěžnost (77,2-97,3 %)	[21]
SPE-HPLC	SupelMIP	>0,9991	0,6-2,0 ng/ml	2,0-6,7 ng/ml	Zkoušeno 7 různých sorbentů	[22]
MSFIA, GC-MS	-	>0,9982	2,0 ng/ml	6,0 ng/ml	Změřeno 7 vzorků/hod	[23]
LC-MS/MS	Oasis HLB	0,994	0,1-0,3 ng/l *	-	*propranolol	[24]
LC/ESI-MS/MS	-	>0,99	50 pg/ml	0,2 ng/ml	Použito 0,3 ml plazmy	[25]
Pro stanovení 16ti betablokátorů z 1-2,5 ml moči byla metoda ELISA určena pro rychlý screening. Pro identifikaci a citlivější stanovení bylo použito metody LC/MS, která umožní stanovení v rozmezí 0,53 až 2,23 ng/ml.						[26]

4. Experimentální část

4.1. Materiál

4.1.1. Chemikálie

Propranolol-hydrochlorid - Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika

Methanol – Sigma – Aldrich, Praha, Česká republika

Demineralizovaná voda - Millipore Milli-Q RG systém, Millipore, USA

Oasis HLB – Waters Corporation, Massachusetts, USA, velikost částic 60 µm

4.1.2. Technické vybavení a software

FIALab 3000, FIALab Instruments, Bellevue, USA

- Pístové čerpadlo (objem pístu 5 ml)
- Osmicestný selekční ventil
- UV-VIS detektor USB 2000/4000

Zdroj světla DH-2000, Micropack, UV-VIS-NIR Lightsource

Magnetická míchačka MM2A, Laboratorní přístroje Praha, ČR

Optická vlákna – průměr 300 µm

Software FIALab pro Windows, FIALab Instruments, Bellevue, USA

4.2. Pracovní postup

4.2.1. Příprava roztoků

4.2.1.1. Zásobní roztoky

Zásobní roztok propranololu o koncentraci 1000 µg/ml (1000 ppm) byl již v laboratoři připraven a uchováván v lednici.

Zásobní roztok propranololu o koncentraci 100 µg/ml (100 ppm) byl připraven ředěním 1 ml zásobního roztoku propranololu o koncentraci 1000 ppm a doplněním methanolem po značku 10 ml odměrné baňky.

Zásobní roztok propranololu o koncentraci 1 µg/ml (1 ppm) byl připraven ředěním 0,1 ml zásobního roztoku o koncentraci 100 ppm a doplněním methanolem po značku 10 ml odměrné baňky.

4.2.1.2. Kalibrační roztoky

Roztoky pro kalibrační křivku byly připraveny ředěním ze zásobního roztoku 100 ppm propranololu destilovanou vodou (H₂O) do 10 ml odměrných baněk. Koncentrace roztoků pro kalibrační křivku byly 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm a 4 ppm. Slepým vzorkem byla destilovaná voda. Příprava roztoků viz. Tabulka č. 2 : Roztoky pro kalibrační křivku.

Tabulka č. 2 : Roztoky pro kalibrační křivku

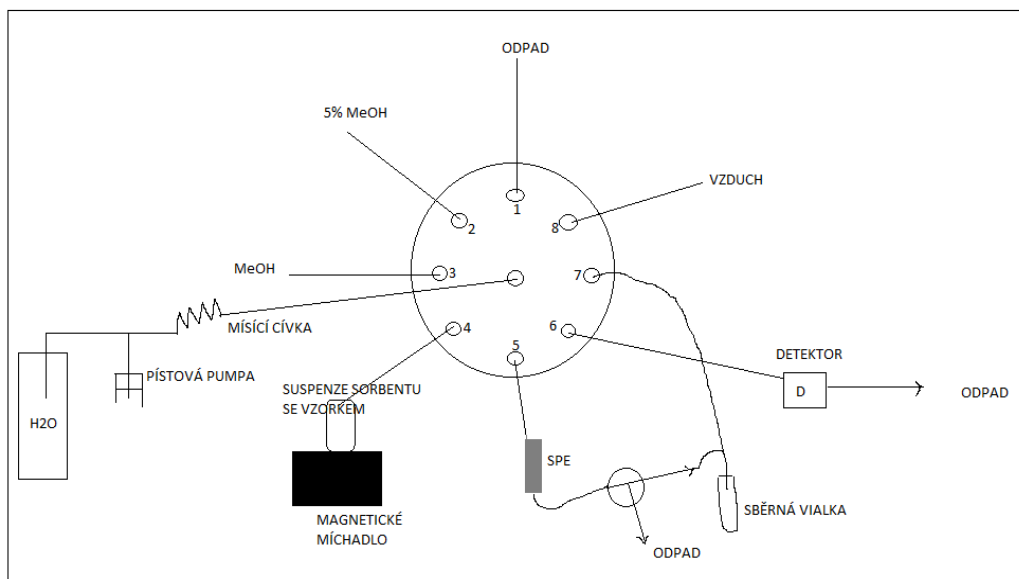
Koncentrace roztoku (ppm)	Objem zásobního roztoku 100 ppm propranololu (ml)	Objem H ₂ O (ml)
0	0	10,00
0,5	0,05	9,95
1,0	0,10	9,90
2,0	0,20	9,80
3,0	0,30	9,70
4,0	0,40	9,60
5,0	0,50	9,50

4.2.2. Výběr postupu využití SPE sorbentu

Pro nevhodnější využití sorbentu byla zkoušena kolonka, která byla naplněna suchými částicemi sorbentu Oasis – HLB a kolonka, která byla vytvořena v systému LOV pomocí aspirace suspenze částic ze skleněné vialky, která byla umístěna na magnetickém míchadle. Zpracování sorbentu mimo průtokový systém je uvedeno v kapitole 5.1.1.

4.2.3. Optimalizace systému

Byl vytvořen program, který začal tvorbou kolonky pro SPE v LOV uspořádání, pokračoval kondicionováním sorbentu, aspirací vzorku, promytím kolonky kvůli odstranění balastu z matrice, elucí analytu a končil detekcí s užitím techniky UV-VIS spektrofotometrie. Detekce byla prováděna při 220 nm s porovnáním při 420 nm. Měření bylo vždy provedeno třikrát u každého vzorku v porovnání se slepým vzorkem – destilovanou vodou. Při měření byl využíván přístrojový systém FIALab 3000 s pístovým čerpadlem a osmicestným selekčním ventilem. Konfigurace systému viz. Obrázek č. 7.



Obrázek č. 7 : Konfigurace systému

4.2.3.1. Optimalizace doby adsorpce a naplnění sorbentu do průtokového systému

Úkolem bylo stanovit čas nutný pro adsorpci testovaného propranololu na sorbent Oasis-HLB. Dále bylo cílem optimalizovat podmínky tak, aby byla kolonka rovnoměrně naplněna bez vytvoření přetlaku při průtoku a postup byl dostatečně opakovatelný. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.2.2.

4.2.3.2. Optimalizace objemu vzorku

Pro optimalizaci objemu vzorku byly použity tři objemy a to 250 μl , 500 μl a 1000 μl . Objemy vzorků 1 ppm propranololu v H_2O byly postupně aspirovány do průtokového systému, poté nízkou průtokovou rychlostí protekly přes kolonku, kde došlo k retenci analytu. Byla pozorována změna absorbance vůči změně objemu vzorku. Výsledky jsou uvedené v kapitole 5.2.3.

4.2.3.3. Optimalizace objemu elučního rozpouštědla pro detekci

Objem elučního rozpouštědla musí být dostačující, aby byl detektor schopen zachytit signál a také aby byl vzorek dostatečně zakoncentrován. Pro tuto optimalizaci bylo použito sedm různých objemů 1 ppm standardu propranololu v methanolu. Objemy byly: 20, 40, 60, 80, 100 a 120 μl . Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.2.4.

4.2.3.4. Optimalizace průtokové rychlosti detekce

Aby bylo možné zajistit dostatečně přesné měření detektoru, bylo potřeba optimalizovat průtokovou rychlost, jakou bude eluát protékat průtokovou celou detektoru. Byla provedena aspirace vzorku 250 μl 1 ppm propranololu v methanolu a poté měřena absorbance detektorem, přičemž vzorek protékal průtokovou celou různou průtokovou rychlostí a to: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 80 $\mu\text{l/s}$. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.2.5.

4.3. Vybrané validační parametry

4.3.1. Lineární rozsah, LOD a LOQ

K sestavení kalibrační závislosti byly použity roztoky o koncentraci 0,5 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 3 ppm a 4 ppm v H₂O. Byl proveden celý postup přípravy vzorku včetně SPE a poté byla měřena absorbance různě koncentrovaných roztoků proti destilované vodě. Výsledné absorbance byly zaneseny do grafu a sestavena rovnice regresní přímky. Byl stanoven limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ).

$$LOD = \frac{3 \cdot \sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{S}$$

σ - směrodatná odchylka měření

S – směrnice kalibrační křivky

Výsledky jsou shrnuté v kapitole 5.5.

4.3.2. Přesnost

Po zjištění optimálních podmínek měření byla zjišťována přesnost měření. Byla měřena absorbance 1 ppm roztoku propranololu ve vodě včetně SPE kroku šesti roztoků za stejných podmínek. Přesnost byla vyjádřena jako směrodatná odchylka SD a relativní směrodatná odchylka RSD. Výsledky jsou uvedeny v kapitole 5.4.

4.4. Analýzy reálné matrice

Po optimalizaci všech parametrů extrakce byla provedena analýza reálné matrice. Byl proměřen vzorek 1 ppm propranololu ve vodovodní vodě, spočítána výtěžnost experimentu a koeficient zakoncentrování. Také byla použita voda ze studny v místě mého bydliště Kamenec u Poličky, sestavena matricová kalibrace z koncentrací 0,5, 1, 2, 3 a 4 ppm propranololu ve studniční vodě a proveden výpočet LOD a LOQ. Výsledky jsou shrnuté v kapitole 5.6.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Výběr postupu využití sorbentu

Při výběru postupu využití sorbentu byl sledován optimální tlak v průtokovém systému při tvorbě SPE kolonky v LOV uspořádání. Optimální pracovní tlak byl v tomto případě tlak, který nebyl příliš vysoký a nezpůsoboval problémy, tedy špatnou těsnost systému, nízkou opakovatelnost či ukončení měření v průběhu probíhajícího experimentu. Když bylo využito postupu plnění kolonky suchými částicemi, docházelo ke vzniku vysokého tlaku v systému, proto bylo využito postupu přípravy suspenze částic sorbentu Oasis – HLB ve vialce umístěné na magnetickém míchadle. Částice byly neustále pomocí míchadla suspendovány a tak nedocházelo k ucpávání portu a nedostatečnému plnění kolonky.

5.1.1. Zpracování sorbentu mimo průtokový systém

Bylo naváženo 100 mg Oasis HLB do kádinky a přidáno 1,2 ml 50% roztoku MeOH s destilovanou vodou. 50% roztok MeOH byl použit, aby se rychle neoddělila pevná část od vodné. Suspenze byla řádně promíchána. Poté bylo odebráno pipetou 100 μ l této suspenze do vialky a doplněno 250 μ l koncentrovaného MeOH. Po usazení pevných částí suspenze byla vodná fáze odstraněna, bylo doplněno 250 μ l destilované vody a promícháno. Po usazení pevných částic byla vodná vrchní fáze opět odstraněna a veškerá sedlina sorbentu byla odebrána do reakční vialky, kam již bylo v rámci experimentu přidáno 100 μ l 1 ppm propranololu a 150 μ l destilované vody, tak aby celkový objem činil 250 μ l.

5.2. Optimalizace systému

5.2.1. Optimalizace tvorby kolonky

Cílem bylo, aby docházelo k automatickému a rovnoměrnému plnění kolonky v systému. Z vialky umístěné na magnetickém míchadle byl aspirován vzorek předem absorbovaný na sorbent Oasis HLB. Výsledky jsou shrnuté v Tabulce č. 3.

Tabulka č. 3 : Optimalizace průtokových rychlostí

Parametr	Výsledek	Rozsah testovaných hodnot
Průtoková rychlost při aspiraci SPE sorbentu	60 $\mu\text{l/s}$	ověřeno experimentálně
Průtoková rychlost při tvorbě kolonky	25 $\mu\text{l/s}$	5-80 $\mu\text{l/s}$

Ve výsledném programu byla provedena tvorba kolonky ve třech krocích, aby byl snížen tlak v průtokovém systému a bylo zajištěno optimální plnění a tvorba kolonky.

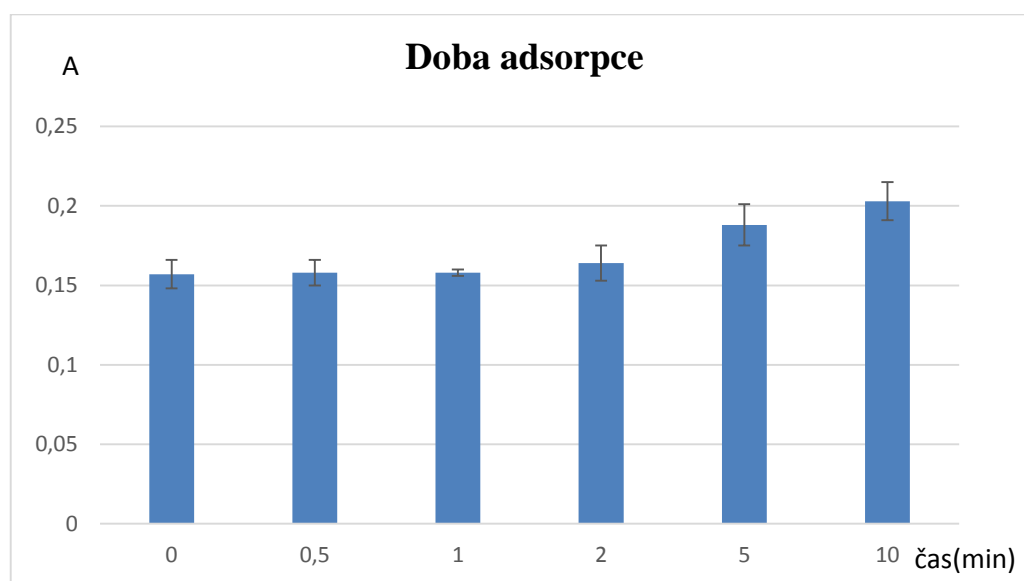
5.2.2. Optimalizace doby adsorpce analytu na SPE

Aby bylo možné stanovit optimální dobu interakce sorbentu s analytem a tedy optimální dobu adsorpce propranololu, bylo nutné proměřit různé doby reakce. Pro měření byly stanoveny tyto časy: 0, 0,5, 1, 2, 5 a 10 minut. Vlastní adsorpce tak probíhala mimo průtokový systém. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce č. 4 a Obrázku č. 8.

Tabulka č. 4 : Výsledky optimalizace doby adsorpce analytu na sorbent

Čas adsorpce (min)	Průměrná absorbance	RSD (%)
0	0,157	5,73
0,5	0,158	5,06
1	0,158	1,27
2	0,164	6,71
5	0,188	6,91
10	0,203	5,91

Měření bylo u každé hodnoty času provedeno třikrát a v této tabulce jsou uvedeny průměrné hodnoty.



Obrázek č. 8 : Závislost absorbance na době adsorpce

Z výsledné tabulky a grafu vyplývá, že nejvhodnější doba adsorpce bude v rozmezí od 30 s do 1 minuty. V tomto intervalu je absorbance měřeného standardu dostatečná a vykazuje nejlepší opakovatelnost (směrodatná odchylka je nejmenší). Při delším čase pro adsorpci hodnota absorbance sice mírně roste, ale směrodatná odchylka je také vyšší, proto byla pro experiment vybrána hodnota 30 s, jakožto doba míchání suspenze sorbentu s analyzovaným vzorkem. Pro experiment by také mohla být použita hodnota 1 minuta, ale vzhledem k časové náročnosti experimentu byla vybrána hodnota 30 s. Pro čas adsorpce 0 s byla také naměřena hodnota absorbance a to zřejmě proto, že extrakce je velmi rychlá.

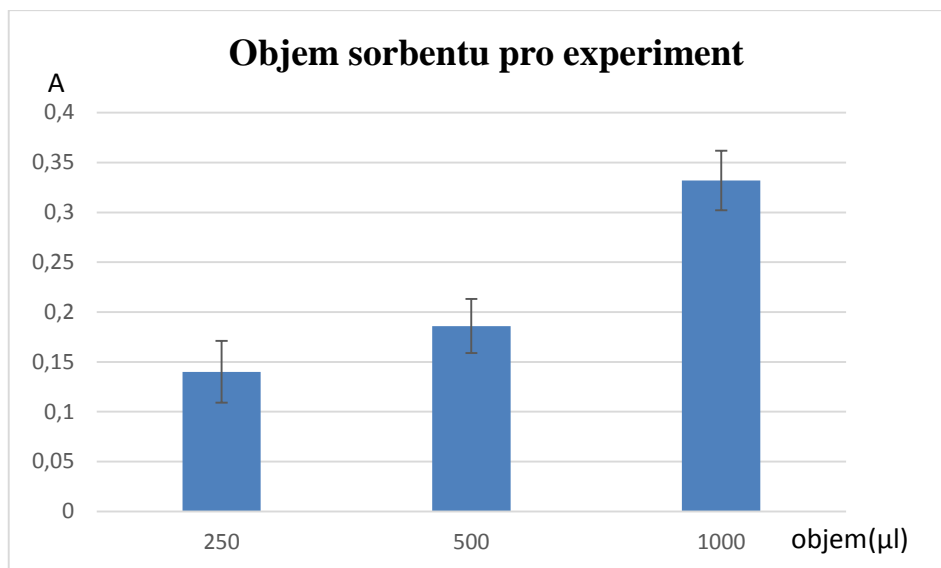
5.2.3. Optimalizace objemu sorbentu

Úkolem bylo zajistit optimální objem sorbentu, který bude aspirován rychlostí 60 $\mu\text{l/s}$ spolu s adsorbovaným analytem z reakční vialky tak, aby docházelo k dostatečnému naplnění kolonky sorbentem, nedocházelo k ucpávání hadiček, vzniku vysokého tlaku v systému a délka měření nebyla příliš dlouhá. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 5 a na Obrázku č. 9.

Tabulka č. 5 : Výsledky optimalizace objemu sorbentu

Počet nástříků	Objem vzorku (μl)	Absorbance	RSD (%)
1	250	0,140	22,14
2	500	0,186	14,52
3	1000	0,332	9,04

Pro každý objem sorbentu byly provedeny tři měření a vypočítána průměrná absorbance z těchto měření, která je uvedena v tabulce. Počet nástříků byl upravován v programu tak, aby vždy byl do systému nasát celý objem. Pokud byl sorbent nasáván najednou, docházelo k ucpávání hadiček sorbentem a docházelo také k růstu tlaku v systému. Proto byla zvolena varianta více kroků aspirace sorbentu do systému.



Obrázek č. 9 : Závislost absorbance na objemu sorbentu

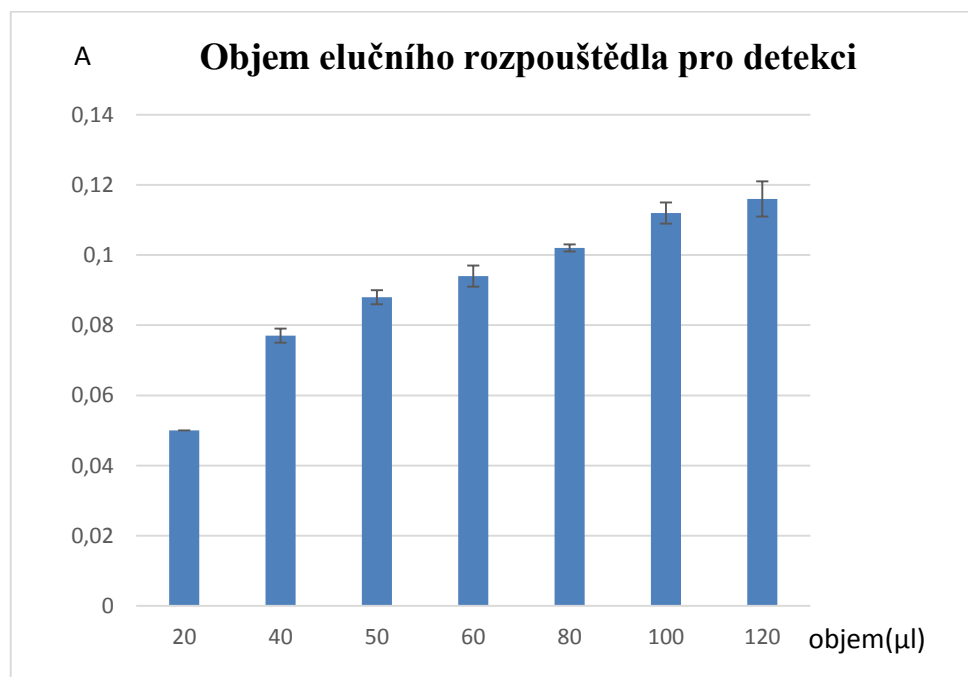
Z výsledků je vidět, že nejvyšší odezva detektoru a nejmenší relativní směrodatné odchylky (9,03 %) bylo dosaženo při měření objemu sorbentu 1000 μl . Proto byl tento objem zvolen jako optimální pro konečné sestavení programu.

5.2.4. Optimalizace objemu elučního rozpouštědla pro detekci

Cílem bylo optimalizovat objem elučního rozpouštědla, který bude aspirován do detektoru, tak aby byla zajištěna dostatečně vysoká a opakovatelná výsledná hodnota absorbance a aby byla zabezpečena efektivní eluce adsorbovaného propranololu. Byly proměřeny hodnoty absorbancí při různých objemech elučního rozpouštědla v rozmezí od 20 μl do 120 μl 1 ppm STD v MeOH. Pro každou hodnotu objemu byla absorbance vzorku proměřena třikrát a poté stanoven průměr a RSD. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce č. 6 a Obrázku č. 10.

Tabulka č. 6 : Výsledky optimalizace objemu elučního rozpouštědla pro detekci

Objem vzorku μl	Absorbance	RSD (%)
20	0,050	0
40	0,077	2,60
50	0,088	2,27
60	0,094	3,19
80	0,102	0,98
100	0,112	2,69
120	0,116	4,31



Obrázek č. 10 : Graf závislosti absorbance na objemu elučního rozpouštědla aspirovaného do detektoru.

Z naměřených výsledků vyplývá, že optimální hodnota objemu, který bude aspirován pro detekci do detektoru, je 100 μl . Hodnota absorbance se s rostoucím objemem zvyšovala, ale po dosažení objemu 100 μl se již absorbance výrazně nezvyšovala. V úvahu by bylo možné brát i hodnotu objemu 120 μl , ale odchylka naměřených absorbancí v tomto případě byla vyšší a tedy opakovatelnost měření při této hodnotě objemu byla nižší. Pro experiment byl tedy zvolen objem 100 μl .

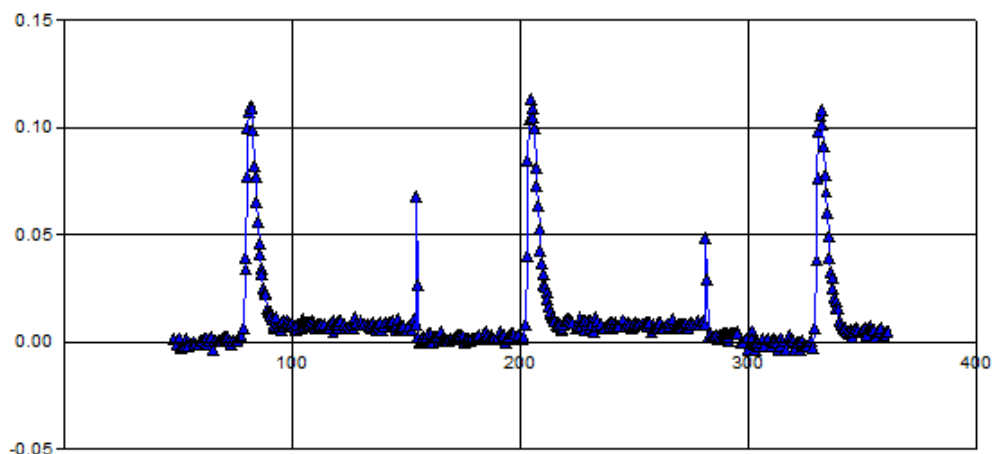
5.2.5. Optimalizace průtokové rychlosti detekce

Cílem bylo zjistit optimální rychlost průtoku eluátu detektorem. Byly změřeny absorbance při různých průtokových rychlostech 250 μl 1 ppm STD v methanolu bez použití sorbentu. Průtokové rychlosti byly: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60 a 80 $\mu\text{l/s}$. Optimální hodnota průtokové rychlosti pro detekci byla hodnocena dle kvality tvaru výsledných píků. Výsledky viz. Tabulka č. 7 a obrázky č. 11 a 12.

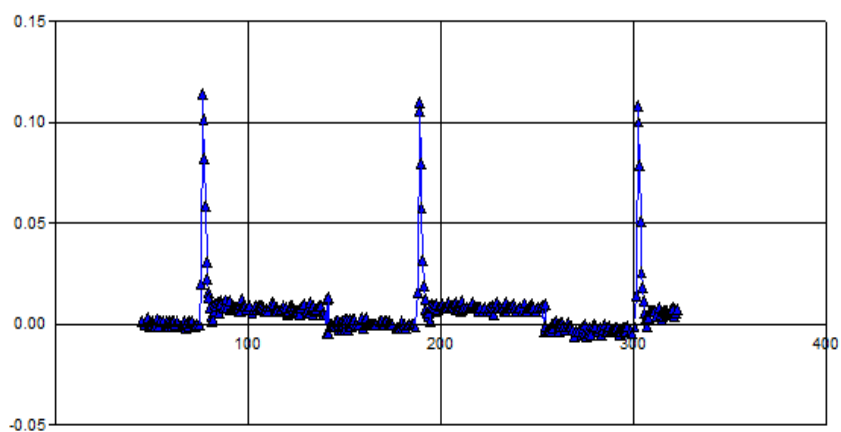
Tabulka č. 7 : Naměřená hodnota absorbance při různých průtokových rychlostech 250 μl 1 ppm STD v MeOH

Průtoková rychlost ($\mu\text{l/s}$)	Absorbance	Průměr absorbancí	RSD (%)
5	0,095	0,096	5,21
	0,092		
	0,102		
10	0,101	0,101	1,98
	0,102		
	0,099		
15	0,110	0,110	1,82
	0,108		
	0,112		
20	0,102	0,110	2,73
	0,097		
	0,101		

25	0,110	0,110	2,73
	0,113		
	0,108		
30	0,116	0,113	2,65
	0,111		
	0,112		
40	0,113	0,110	1,82
	0,109		
	0,109		
50	0,114	0,109	3,64
	0,106		
	0,107		
60	0,113	0,110	1,82
	0,109		
	0,109		
80	0,109	0,110	0,91
	0,110		
	0,111		



Obrázek č. 11 : Záznam měření 250 µl 1 ppm STD v MeOH, průtoková rychlost 25 µl/s



Obrázek č. 12 : Záznam měření 250 µl 1 ppm STD v MeOH, průtoková rychlost 80 µl/s

Byly porovnány výsledné píky a určena optimální hodnota průtokové rychlosti pro detekci a to 25 µl/s. Optimální hodnota rychlosti byla vybrána dle množství bodů píku v oblasti nejvyšší absorbance a také podle směrodatných odchylek měření. Jak můžete vidět na obrázku č. 11, je množství bodů ve vrchní oblasti vyšší v porovnání s množstvím bodů na Obrázku č. 12, kde jsou zobrazeny výsledky měření pro průtokovou rychlost 80 µl/s. Platí tedy, že čím je větší počet bodů ve vrcholu píku, tím je měření přesnější. Na záznamu měření je vidět několik menších píků. Ty pravděpodobně způsobily mikrobublinky, které vznikly v systému při mísení rozpouštědel.

5.3. Výsledný program

Dle optimalizovaných podmínek systému byl upraven celý program pro stanovení propranololu do konečné verze.

Nastavení parametrů programu	Hardware Settings Wavelength 1 (nm) 220 Hardware Settings Wavelength 4 (nm) 420 Hardware Settings Use Wavelength 4 as Reference Hardware Settings Scan Rate (Hz) 20 Hardware Settings Integration Time (msec) 40 Hardware Settings Samples to Average 9
	Syringe Pump Valve In Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 250 Syringe Pump Aspirate (microliter) 1000
Doba adsorpce	Delay (sec) 30
	Loop Start (#) 3
Aspirace suspenze částic a vzorku	Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 50 Syringe Pump Aspirate (microliter) 50
	Valve 1 port 4 <i>Sample + bead</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Aspirate (microliter) 480
Tvorba kolonky	Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 550 Delay (sec) 6
Vymytí zbytku sorbentu do odpadu	Valve 1 port 1 <i>Waste</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 80 Syringe Pump Dispense (microliter) 120
	Loop End
Promytí zbytku matrice	Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Aspirate (microliter) 40
Promytí kolonky 5% MeOH	Valve 1 port 2 <i>5% MeOH</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Aspirate (microliter) 500
	Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Dispense (microliter) 60 Syringe Pump Delay Until Done Syringe Pump Valve Out
	Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 500 Delay (sec) 2
	Valve 1 port 1 <i>Waste</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 80 Syringe Pump Dispense (microliter) 100

	Promytí kolonky vodou	Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 500 Delay (sec) 6	
	Sušení sorbentu vzduchem	Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Aspirate (microliter) 400	
		Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 380	
	Ruční přeprnutí	Turn Valve to external collector	
Eluce analytu		Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Aspirate (microliter) 50	
		Valve 1 port 3 <i>MeOH</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 80 Syringe Pump Aspirate (microliter) 200	
		Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Dispense (microliter) 60	
		Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 10 Syringe Pump Dispense (microliter) 220 Delay (sec) 4	
		Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Aspirate (microliter) 400	
		Valve 1 port 5 <i>Column</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 380	
		Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 120 Syringe Pump Aspirate (microliter) 300 Syringe Pump Valve Out	
		Valve 1 port 1 <i>Waste</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 50 Syringe Pump Dispense (microliter) 100	
		Ruční operace	Put tube into external vessel
			Valve 1 port 7 <i>External vessel</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Aspirate (microliter) 120
			Valve 1 port 1 <i>Waste</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 60 Syringe Pump Dispense (microliter) 160
			Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 250 Syringe Pump Aspirate (microliter) 500 Syringe Pump Valve Out

		Valve 1 port 8 <i>Air</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Aspirate (microliter) 40
	Aspirace elučního činidla	Valve 1 port 3 <i>MeOH</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 100 Syringe Pump Aspirate (microliter) 700
		Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Dispense (microliter) 60 Syringe Pump Valve Out
	Měření absorbance v elučním rozpuštědle - methanolu	Valve 1 port 6 <i>Detector</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 150 Delay (sec) 4
		Analyte New Sample Delay (sec) 2 Spectrometer Reference Scan
		Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Aspirate (microliter) 60 Syringe Pump Valve Out
	Aspirace eluátu	Valve 1 port 7 <i>External vessel</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Aspirate (microliter) 100
		Valve 1 port 3 <i>MeOH</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 50 Syringe Pump Aspirate (microliter) 150
		Syringe Pump Valve In <i>H₂O</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 40 Syringe Pump Dispense (microliter) 60 Syringe Pump Valve Out
		Spectrometer Absorbance Scanning
Monitoring		Valve 1 port 6 <i>Detector</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 25 Syringe Pump Dispense (microliter) 650
		Valve 1 port 1 <i>Waste</i> Syringe Pump Flowrate (microliter/sec) 80 Syringe Pump Empty
		Spectrometer Stop Scanning

Pokračování programu již není uvedeno. Po dokončeném monitorovacím kroku byl proveden krok, při kterém byl odstraněn zbytek sorbentu z kolonky a poté promyt celý systém methanolem a odpad odveden do sběrné odpadní kádinky.

Konfigurace systému i program je složitý, je nutné provádět některé operace ručně (např. přepnutí toku do sběrné vialky). Vzorek pro analýzu byl připravován off-line. Také průběh každého stanovení byl velmi časově náročný, ale bylo dosaženo vysoké citlivosti metody.

5.4. Přesnost

Přesnost byla zjišťována za optimálních podmínek měření pro standard o koncentraci 1 ppm dávkovaný v destilované vodě. Měření individuálně připravených roztoků včetně SPE bylo provedeno šestkrát, zjištěna hodnota absorbance a vyhodnocena směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka. Výsledky jsou shrnuté v Tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Výsledky měření opakovatelnosti

Měření č.	Absorbance
1	0,470
2	0,469
3	0,484
4	0,463
5	0,493
6	0,488
Průměr	0,478
SD	0,012
RSD (%)	2,51

Hodnota relativní směrodatné odchylky pro koncentraci 1 ppm propranololu má hodnotu 2,51%.

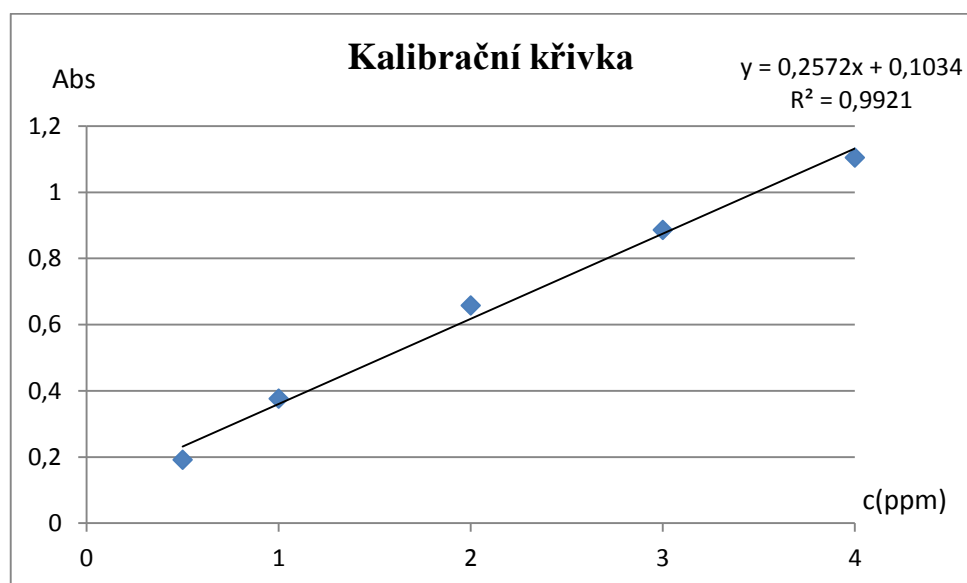
5.5. Hodnocení linearity v destilované vodě

V rozmezí 0,5 ppm až 4 ppm propranololu v destilované vodě včetně SPE kroku byla testována kalibrační závislost. Z ní byly vyjádřeny parametry lineární regrese a limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 9 a na Obrázku č. 13.

Tabulka č. 9 : Výsledky měření kalibrační závislosti

Koncentrace kalibračního roztoku (ppm)	Absorbance					
	Měření					
	1	2	3	Průměr absorbancí	SD	RSD (%)
0,5	0,192	0,190	0,193	0,192	0,002	1,04
1	0,334	0,370	0,384	0,363	0,026	7,16
2	0,628	0,661	0,654	0,648	0,017	2,62
3	0,939	0,884	0,835	0,886	0,052	5,87
4	1,108	1,091	1,117	1,105	0,013	1,18

Hodnoty absorbance v tabulce u jednotlivých měření jsou uvedeny po odečtení slepého vzorku vody. Absorbance slepého vzorku byla 0,06.



Obrázek č. 13 : Kalibrační závislost absorbance na koncentraci propranololu

Absorbance v rozmezí od 0,5 ppm do 4 ppm lineárně rostla. Determinační koeficient křivky byl 0,9921. Limit detekce, který byl vypočítán z kalibrační závislosti, byl LOD = 0,442 ppm a limit kvantifikace byl LOQ = 1,473 ppm.

5.6. Analýza reálné matrice

5.6.1. Analýza reálné matrice – vodovodní voda

Po proměření kalibračních roztoků, kde byla jako rozpouštědlo pro vzorek použita destilovaná voda, byl změřen vzorek 1 ppm propranololu s vodou z vodovodního řádu. Byla proměřena absorbance slepého vzorku ($A = 0,133$) - voda z kohoutku a následně tato hodnota odečtena od hodnoty 1 ppm vzorku propranololu ve vodovodní vodě ($A = 0,459$). Výsledná hodnota absorbance byla 0,326. Byla vypočítána výtěžnost, která činila 89,81 % a koeficient zakoncentrování, který činil 8,98.

Výpočty: Výtěžnost

1 ppm propranolol v destilované vodě: $A = 0,363 \dots\dots\dots 100 \%$

1 ppm propranolol ve vodovodní vodě: $A = 0,326 \dots\dots\dots x \%$

$$x = \frac{0,326}{0,363} * 100 = 89,81 \%$$

Koeficient zakoncentrování

$$\frac{\text{objem vzorku } (\mu\text{l})}{\text{objem roztpuštědla } (\mu\text{l})} * \text{výtěžnost} = \frac{1000}{100} * 0,898 = 8,98$$

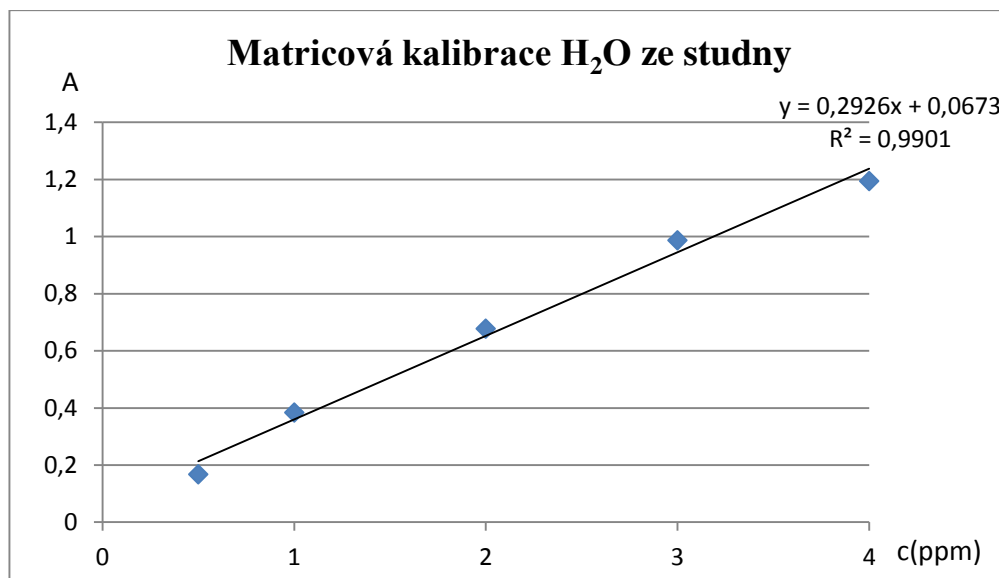
5.6.2. Analýza reálné matrice - povrchová voda

Jako model reálné matrice byla použita studniční voda z oblasti Kamenec u Poličky a do ní byly přidávány příslušné koncentrace propranololu v rozmezí 0,5 ppm až 4 ppm. Byla sestavena matricová kalibrace a z ní byly vyjádřeny parametry lineární regrese a limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 10 a na Obrázku č. 14.

Tabulka č. 10 : Výsledky měření kalibrační závislosti absorbance vzorků ze stud. vody

Koncentrace kalibračního roztoku (ppm)	Absorbance					
	Měření					
	1	2	3	Průměr absorbancí	SD	RSD (%)
0,5	0,169	0,170	0,162	0,167	0,004	2,40
1	0,372	0,368	0,413	0,384	0,003	0,78
2	0,677	0,687	0,667	0,677	0,010	1,48
3	0,991	0,995	0,976	0,987	0,010	1,01
4	1,167	1,245	1,169	1,194	0,044	3,69

Hodnoty absorbance jsou uvedeny v tabulce po odečtení slepého vzorku (studniční vody), jehož absorbance byla 0,120.



Obrázek č. 14 : Kalibrační závislost absorpance na koncentraci propranololu ve vodě ze studny

Absorbance v rozmezí od 0,5 ppm do 4 ppm lineárně roste. Determinační koeficient křivky je 0,9901. Limit detekce, který byl vypočítán z kalibrační závislosti, byl LOD = 0,496 ppm a limit kvantifikace byl LOQ = 1,653 ppm.

Linearita při měření v destilované vodě ($R^2 = 0,9921$) a povrchové studniční vodě ($R^2 = 0,9901$) je porovnatelná. Hodnoceno dle determinačního koeficientu lineární přímky.

Při porovnání limitu detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) u lineární závislosti propranololu v destilované vodě a matricové kalibrace propranololu ve vodě povrchové studniční byl nalezen malý rozdíl hodnot. Limit detekce u experimentu s povrchovou vodou činil 0,496 ppm, což je oproti destilované vodě (LOD = 0,442 ppm) mírně vyšší, ale porovnatelná koncentrace. Při porovnání limitů kvantifikace (LOQ) byl rozdíl hodnot výraznější. Limit kvantifikace u experimentu s destilovanou vodou byl 1,473 ppm, LOQ u povrchové vody činil 1,653 ppm, což je o 12,22 % vyšší hodnota než u destilované vody.

6. Souhrn

Experimentální část této diplomové práce začala tím, že byl vybrán nevhodnější způsob využití sorbentu Oasis HLB. Poté byl vytvořen celý program pro metodu stanovení propranololu ve vodných vzorcích. Elučním činidlem byl čistý methanol.

Postupně byly optimalizovány parametry měření v SIA systému, jako jsou: tvorba kolonky, doba adsorpce propranololu na sorbent, objem vzorku, objem elučního rozpouštědla pro detekci analytu, průtoková rychlost detekce. Výsledné optimalizované parametry jsou uvedené v Tabulce č. 11.

Stanovení bylo optimalizováno s účelem vyvinout co nejcitlivější metodu pro případnou aplikaci při analýze povrchové nebo odpadní vody, kde bude koncentrace léčiva velmi nízká.

Po optimalizaci následovalo proměření kalibrační závislosti propranololu v destilované vodě, byl vyjádřen limit detekce a limit kvantifikace. Také byla změřena přesnost měření pro koncentraci 1 ppm propranololu v destilované vodě.

Výtěžnost metody byla ověřena pro stanovení propranololu ve vodovodní vodě.

Tabulka č. 11 : Výsledné optimalizované parametry

Parametr	Výsledek
Eluční rozpouštědlo	Methanol
Využití sorbentu	Kolonka tvořena pomocí aspirace suspenze z vialky na magnetické míchače
Doba adsorpce propranololu na sorbent	30 s mimo průtokový systém
Objem vzorku	1000 μ l
Objem elučního rozpouštědla pro detekci	100 μ l
Průtoková rychlost detekce	25 μ l/s

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení propranololu s využitím extrakce na tuhé fázi a automatizovat ji v systému sekvenční injekční analýzy s UV detekcí. Po nalezení optimálních parametrů měření byla sestavena kalibrační závislost s determinačním koeficientem 0,9921. Byl stanoven limit detekce (LOD = 0,442 $\mu\text{g/ml}$) a limit kvantifikace (LOQ = 1,473 $\mu\text{g/ml}$). Poté byla ověřena přesnost měření a stanovena relativní směrodatná odchylka pro koncentraci 1 ppm (RSD = 2,51%). Účinnost vyvinuté metody byla zkoušena pomocí matrice vzorků vod z různých zdrojů se známým množstvím přidaného propranololu. Metodu se zatím nepodařilo plně automatizovat. Dosažené limity detekce a kvantifikace jsou v porovnání s články nalezenými v literatuře stále poměrně vysoké, což je způsobeno hlavně využitím spektrofotometrického detektoru s optickými vlákny.

8. Seznam literatury

- [1] Nigel J. K. Simpson. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications*, CRC Press, New York, 2000.
- [2] Guide to Solid Phase Extraction, *Buletin 910*
[online]<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
(accessed Febr 15, 2016)
- [3] Waters, Oasis HLB 6 cc Vac Cartridge, 200 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm Particle Size, 30/pk [online]
<http://www.waters.com/waters/partDetail.htm?partNumber=WAT106202>
(accessed Febr 15, 2016)
- [4] KLOUDA, PAVEL. *Moderní analytické metody*. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 2003. 80-86369-07-2.
- [5] Waters, Oasis HLB Cartidges and 96-Well Plates [online]
<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715000109.pdf> (accessed Febr 15, 2016)
- [6] Waters, Oasis sample extraction products [online]
<http://www.cienytech.com/tablas/Cartuchos%20Oasis.pdf> (accessed Febr 15, 2016)
- [7] Waters, Oasis sample extraction products [online]
http://www.waters.com/waters/en_CZ/Oasis-Sample-Extraction-Products/nav.htm?cid=513209&locale=en_CZ (accessed Febr 15, 2016)
- [8] Labicom, Supelco [online] <http://www.labicom.cz/supelco-139/> (accessed Febr 25, 2016)
- [9] Moderní trendy v přípravě vzorku k analýze s využitím instrumentálních technik [online] http://www.pragolab.cz/files/udalosti/2014-10/01_LNovakova.pdf
(accessed Febr 25, 2016)
- [10] Vzorec propranololu,
Wikipedia[online]<https://en.wikipedia.org/wiki/Propranolol> (accessed Febr 18, 2016)
- [11] Český lékopis 2009. Grada Publishing a.s.: Praha, CZ, 2009
- [12] Sklenář Zbyněk, Horáčková Kateřina. *Nové léčivé látky v magistraliter receptuře XII – propranolol- hydrochlorid*. Praktické lékařství [online] 2012, p. 25-27 <http://www.praktickelekarenstvi.cz/pdfs/lek/2012/01/08.pdf> (accessed Febr 18, 2016)

- [13] Růžička, J. Flow Injection Analysis: Tutorial and News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online] 2016 ed., <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html> (accessed Febr 18, 2016)
- [14] Růžička, J. Flow Injection Analysis: Tutorial and News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online] 2016 ed., <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.3.%20Mixing%20by%20Dispersion.html> (accessed Febr 16, 2016)
- [15] Miró, M.; Hansen, E.H. Recent Advances and Future Prospects of Mesofluidic Lab-on-a-Valve Platforms in Analytical Science: A Critical Review. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 750, p 3-15.
- [16] Růžička, J. Flow Injection Analysis: Tutorial and News on Flow Based micro Analytical Techniques [Online] 2016 ed., <http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.2.4.%20Concentration%20Gradient.html> (accessed Febr 19, 2016)
- [17] Lab-on-Valve SIA. *FIAlab* [Online], <http://flowinjection.com/index.php/products?sid=102&pid=54> (accessed Febr 19, 2016)
- [18] Luque de Castro, M.D.; Ruiz-Jiménez, J.; Pérez-Serradilla, J.A. Lab-on-Valve: A Useful Toll in Biochemical Analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2008, 27, p 118-126.
- [19] Vidigal S.; Tóth I. V.; Rangel A. Sequential injection-LOV format for peak height and kinetic measurement modes in the spectrophotometric enzymatic determination of ethanol: Application to different alcoholic beverages, *Talanta*, 2008, p. 1-6.
- [20] Vidigal S.; Tóth I. V.; Rangel A. Sequential injection lab-on-valve platform as a miniaturisation tool for solid phase extraction. *Analytical Methods*. 2013, vol. 5, p. 585-597.
- [21] Salem A. A., Wasfi I. A., Al-Nassibbi S. S. Trace determination of beta-blockers and beta (2) -agonists in distilled and waste-waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*. 2012, vol. 908, p. 27-38.
- [22] Boonjob W., Sklenarova H., Lara F. J., Garcia-Campana A. M., Solich P. Retention and selectivity of basic drugs on solid-phase extraction sorbents: Application to direct determination of beta-blockers in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014, vol. 406, p. 4207-4215.
- [23] Rosario Brunetto del M.; Clavijo S.; Delgado Y.; Orozco W.; Gallignani M.; Ayala C.; Cerdá V., Development of a MSFIA sample treatment system as front end of GC-MS for atenolol and propranolol determination in human plasma. *Talanta*. 2015, vol. 132, p. 15-32.

- [24] Stankiewicz A.; Giebultowicz J.; Stefański M.; Sikorska K.; Wroczyński P.; Nalecz-Jawecki G., The development of the LC-MS/MS method based on S-9 biotransformation for detection of metabolites of selected β -adrenolytics in surface water. *Environmental toxicology and pharmacology*. 2015, vol. 39, p.906-916.
- [25] Partani P.; Modhave Y.; Gurule S.; Khuroo A.; Monif T., Simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxy propranolol in human plasma by solid phase extraction and liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2009, vol. 50, p. 966-976.
- [26] Pujos E., Creen-Olive C., Paisse O., Flament-Waton M. M., Grenier-Loustalot M. F. Comparison of the analysis of beta-blockers by different techniques. *Journal of Chromatography B*. 2009, vol. 877, s. 4007-4014.

Seznam tabulek

Tabulka č. 1	Shrnutí výsledků citovaných odborných článků
Tabulka č. 2	Roztoky pro kalibrační křivku
Tabulka č. 3	Optimalizace průtokových rychlostí
Tabulka č. 4	Výsledky optimalizace doby adsorpce analytu na sorbent
Tabulka č. 5	Výsledky optimalizace objemu sorbentu
Tabulka č. 6	Výsledky optimalizace objemu elučního rozpouštědla pro detekci
Tabulka č. 7	Naměřená hodnota absorbance při různých průtokových rychlostech 250 μ l 1 ppm STD v MeOH
Tabulka č. 8	Výsledky měření opakovatelnosti
Tabulka č. 9	Výsledky měření kalibrační závislosti
Tabulka č. 10	Výsledky měření kalibrační závislosti absorbance vzorků ze studniční vody
Tabulka č. 11	Výsledné optimalizované parametry

Seznam obrázků

Obrázek č. 1	Uložení sorbentu
Obrázek č. 2	Typy sorbentu Oasis
Obrázek č. 3	Vzorec propranololu
Obrázek č. 4	Princip metody SIA
Obrázek č. 5	Základní schéma SIA
Obrázek č. 6	Uspořádání LOV systému
Obrázek č. 7	Konfigurace systému
Obrázek č. 8	Závislost absorbance na době adsorpce
Obrázek č. 9	Závislost absorbance na objemu sorbentu
Obrázek č. 10	Graf závislosti absorbance na objemu elučního rozpouštědla aspirovaného do detektoru.
Obrázek č. 11	Záznam měření 250 μ l 1 ppm STD v MeOH, průtoková rychlost 25 μ l/s
Obrázek č. 12	Záznam měření 250 μ l 1 ppm STD v MeOH, průtoková rychlost 80 μ l/s
Obrázek č. 13	Kalibrační závislost absorbance na koncentraci propranololu
Obrázek č. 14	Kalibrační závislost absorbance na koncentraci propranololu ve vodě ze studny