

UNIVERZITA KARLOVA

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Optimalizace metody pro stanovení jódu v moči v průtokovém systému s využitím extrakce tuhou fází

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

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

HRADEC KRÁLOVÉ, 2018

Bc. ZUZANA LIPENSKÁ

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

V Hradci Králové

Ráda bych poděkovala paní PharmDr. Ivaně Horstkotte Šrámkové, Ph.D, vedoucí mé diplomové za odborné vedení a cenné rady a připomínky, které mi pomohly zpracovat tuto diplomovou práci.

ABSTRAKT

Katedra:	Katedra analytické chemie
Kandidát:	Bc. Zuzana Lipenská
Školitel:	PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.
Konzultant:	Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.
Název diplomové práce:	Optimalizace metody pro stanovení jódu v moči v průtokovém systému s využitím extrakce tuhou fází

Jód představuje pro lidské tělo důležitý prvek zajišťující správnou funkci štítné žlázy. Tento orgán produkuje hormony tyroxin a trijódtyronin nezbytné pro vývoj mozku či správnou funkci jiných hormonů (katecholaminy). Lidský organismus si není schopen jód vyrobit, proto jedinou možností příjmu je potrava. Nesprávná hladina tohoto prvku může způsobit vážné zdravotní komplikace, např. kongenitální mentální retardaci.

Jód je nejčastěji stanovován v moči, k čemuž je potřeba spolehlivá a citlivá metoda. Nejvíce využívanou metodou je spektrofotometrická analýza založená na Sandellově-Kolthoffově reakci. Při stanovení jódu v moči je výhodné použít průtokové metody zajišťující dostatečnou citlivost a automatizaci měření.

Většina metod pro monitorování jódu využívá toxická činidla či při jejich analýze vzniká odpad ohrožující kvalitu životního prostředí. Cílem diplomové práce bylo optimalizovat hydrodynamické a chemické parametry analýzy jódu v moči pomocí průtokové techniky Lab-In-Syringe a ověřit použití metody na reálných vzorcích moči.

ABSTRACT

Department:	Department of Analytical Chemistry
Candidate:	Bc. Zuzana Lipenská
Supervisor:	PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.
Consultant	Doc. PharmDr. Hana Sklenářová, Ph.D.
Title of diploma thesis:	Optimization of a method for iodine determination in urine in a flow system using solid phase extraction

Iodine is an important element for the human body to ensure proper functioning of thyroid gland. This organ produces the hormones thyroxine and triiodothyronine necessary for proper brain development and correct function of other hormones (catecholamines). The human body is unable to produce iodine, so the only income is via food. Incorrect level of this element can cause serious health complications, such as congenital mental retardation.

Body level of iodine is most commonly determined from urine, which requires a reliable and sensitive method. The most widely used method is spectrophotometric analysis based on the Sandell-Kolthoff reaction. For urinary iodine determination, it is advantageous to use flow methods to ensure sufficient measurement sensitivity and automation.

Most methods of iodine monitoring use toxic reagents or generate toxic waste. The aim of this diploma thesis was to optimize the hydrodynamic and chemical parameters of a method for urine iodine analysis using Lab-In-Syringe flow technique and to verify the possibility of application of this method in real urine samples.

OBSAH

ABSTRAKT	4
ABSTRACT	5
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	8
1. ÚVOD	9
2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE	10
3. TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1 Charakteristika jódu.....	11
3.2 Jód v organismu	11
3.3 Jód a štítná žláza	12
3.3.1 <i>Nedostatek jódu v organismu</i>	12
3.3.2 <i>Nadbytek jódu v organismu</i>	13
3.4 Metody stanovení jódu v biologické matrici	14
3.5 Průtokové techniky.....	17
3.5.1 <i>Průtoková injekční analýza</i>	17
3.5.2 <i>Sekvenční injekční analýza</i>	18
3.5.3 <i>Lab-On-Valve analýza</i>	19
3.5.4 <i>Sekvenční injekční chromatografie</i>	20
3.5.5 <i>Lab-In-Syringe analýza</i>	21
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	22
4.1 Popis metody a chemikálie.....	22
4.1.1 <i>Použité chemikálie</i>	22
4.1.2 <i>Příprava roztoků</i>	23
4.1.3 <i>Přístrojové vybavení</i>	25
4.1.4 <i>Princip stanovení</i>	26

4.1.5	Metoda.....	28
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	29
5.1	Předběžné experimenty - Výběr sorbentu pro extrakci jodidu v manuálním provedení.....	29
5.2	Optimalizace objemu elučního činidla chloridu sodného	32
5.3	Optimalizace objemu citrátového pufru	33
5.4	Promytí systému isopropanolem	34
5.5	Optimalizace objemu kyseliny chlorovodíkové	36
5.6	Vhodné pořadí aspirace indikátoru a pufru	37
5.7	Optimalizace průtokové rychlosti eluce jodidu	38
5.8	Optimalizace průtokové rychlosti aspirace standardu	39
5.9	Optimalizace času oxidace genciánové violeti	40
5.10	Analytické parametry metody	42
5.11	Měření reálného vzorku	46
5.12	Extrakční účinnost SPE kolony	48
6.	SOUHRN.....	49
7.	ZÁVĚR.....	50
8.	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	51
	SEZNAM GRAFŮ	56
	SEZNAM TABULEK.....	56
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	57
	SEZNAM ROVNIC.....	57
9.	PŘÍLOHA Č. 1: Program na měření kalibrační křivky.....	58

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<i>zkratka</i>	<i>český význam</i>
FIA	Průtoková injekční analýza
LIS	Lab-In-Syringe analýza
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace
LOV	Lab-On-Valve analýza
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SD	Směrodatná odchylka
SIA	Sekvenční injekční analýza
SIC	Sekvenční injekční chromatografie
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
T3	Trijódtyronin
T4	Tyroxin
TMAHP 100	Aniontový iontoměnič na bázi celulózy s velikostí pórů 100 μm

1. ÚVOD

Jód patří mezi stopové prvky nacházející se v nejvyšší míře v mořích a oceánech. Tento prvek je nezbytný pro lidské tělo, jedná se o esenciální element, proto je kladen vysoký důraz na dostatečný příjem jódu potravou.

Hlavní úlohou jódu je tvorba hormonů štítné žlázy tyroxinu a trijódtyroninu. Při neodpovídající hladině jódu dochází k nadbytečné či nedostatečné tvorbě zmíněných hormonů, což se projevuje onemocněním štítné žlázy. Mezi nemoci štítné žlázy patří endemická struma, hypotyreóza a hypertyreóza.

Pro monitorování hladiny jódu v moči je třeba používat spolehlivé metody, které by odhalily skutečný příjem jódu do organismu. V diplomové práci byla optimalizována analytická metoda s využitím techniky Lab-In-Syringe (LIS) pro stanovení jódu v moči. LIS je průtokovou neseparační metodou, při které jsou roztoky nasávány do pístové pumpy podle ovládacího programu v přesně daném pořadí. Uvnitř rezervoáru pístového čerpadla probíhá chemická reakce dokonale promíchaných reagentů, což zajišťuje magnetické míchadlo rotující díky externímu magnetickému poli. Vzniklý produkt je transportován do detekční cely a je měřena absorbance roztoku.

2. CÍL A POPIS ZADÁNÍ PRÁCE

Cílem této diplomové práce je optimalizovat metodu pro stanovení jódu v průtokovém systému a následně tuto metodu použít na měření koncentrace jódu ve vzorcích moči.

V **teoretické části** je cílem:

- popsat význam a výskyt jódu,
- popsat jednotlivé průtokové metody,
- seznámit se způsoby stanovení jódu v moči.

V **praktické části** diplomové práce je cílem:

- optimalizovat chemické parametry metody stanovení jódu pomocí genciánové violeti,
- optimalizovat hydrodynamické parametry automatizované průtokové metody,
- ověřit možnost zvýšení citlivosti metody použitím delší detekční cely místo extrakce do organického rozpouštědla,
- vybrat sorbent pro extrakci tuhými fázemi a odstranění matrice,
- ověřit možnost použití metody na reálných vzorcích.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Charakteristika jódu

Jód patří mezi nekovové prvky. Nalézt ho je možné v horninách, půdě ve formě sloučenin jodidu a jodičnanu, dále s vyšší koncentrací v mořích a oceánech, kam se dostává s vodními srážkami. Velké množství tohoto prvku obsahují také mořské ryby a řasy, odkud se jód může dostávat do organismu, kde vzhledem k zastoupení vystupuje jako stopový prvek [1, 2].

3.2 Jód v organismu

Jód se do organismu dostává potravinami, proto skladba našeho jídelníčku a původ stravy má velký vliv na hladinu tohoto prvku v těle. Vhodný příjem jódu pro dospělého člověka je 150-200 µg/den [3]. K redukci na jodid a následnému vstřebávání jódu dochází v tenkém střevě. Celková koncentrace jódu v krvi je okolo 40-80 µg/l a v organismu přibližně 10-20 mg [2]. Denní potřeba tohoto prvku je uvedena v tabulce 1.

K vylučování jódu dochází z 90 % močí, zbytek z organismu odchází stolicí, potem a mateřským mlékem [1]. Proto je stanovení jódu v moči vhodným indikátorem příjmu tohoto prvku.

Tabulka 1 Denní potřeba jodu [2]

Věkové období	Mikrogramy/den
kojenci	90-100
děti	100-120
dospívající a dospělí	15-200
těhotné a kojící ženy	200-250

3.3 Jód a štítná žláza

Štítná žláza reguluje lidský metabolismus působením hormonů této žlázy. Zásadní vliv na produkci zmíněných hormonů má jód svojí extrakcí z krve a začleněním se do hormonů štítné žlázy. Nedostatek nebo naopak zvýšený příjem jódu má značný vliv na tvorbu hormonů štítné žlázy tyroxinu (T4) a trijódtyroninu (T3). Produkce T3 dosahuje přibližně 80 % a T4 20 % [4].

Jód je vychytáván folikulárními buňkami štítné žlázy. Zde je prvek oxidován tyreoidální peroxidázou na reaktivní volný jód, který je vázán na tyrozin za vzniku monojódtyrozinu a dijódtyrozinu. Jedná se o neaktivní prekurzory, po jejichž spojení se mění na T4, T3 a jsou vázány na bílkovinu tyreoglobulin a uchovávány ve folikulech štítné žlázy [5]. Vlivem tyreotropního hormonu ovlivňuje hypotalamo-hypofyzární systém sekreci hormonů štítné žlázy do krve [6]. Syntéza a uvolňování T3 a T4 je ovlivňována jejich cirkulující hladinou tj. mechanismem negativní zpětné vazby. Při vysokých hladinách T3 a T4 je nízká produkce tyreotropinu, jeho tvorba naopak roste při nízkých hladinách hormonů štítné žlázy, velkém množství estrogenu a stresu [7]. Štítná žláza v menším množství produkuje také hormon kalcitonin, který reguluje hladinu vápníku v krvi [4].

Jód navázaný na hormony se z nich v játrech a ledvinách uvolní a může být znovu absorbován štítnou žlázou, přesto se ale část jódu ztratí v zaživacím traktu [7].

Důsledkem nesprávné hladiny jódu nebo výše uvedených hormonů může dojít k onemocnění štítné žlázy. Mezi nemoci štítné žlázy se řadí prostá struma, tyreotoxikóza, hypothyreóza, hypertyreóza, záněty a nádory [8].

3.3.1 Nedostatek jódu v organismu

Deficit jódu velmi často způsobuje hypothyreózu nebo strumu.

Hypothyreóza

Nedostatek jódu vede k nízké produkci hormonů štítné žlázy a tím také ke snížení její funkce. Tento stav se nazývá primární hypothyreóza. Lidé trpící hypothyreózou projevují příznaky „pomalého“ metabolismu. Mezi nejčastější projevy patří ztráta

energie, únava, pocit zimy, suchá kůže a vlasy, ztráta vlasů, mírné zvýšení hmotnosti, ztráta chuti k jídlu či ztráta paměti [9].

Struma

Struma je onemocnění projevující se zvětšením štítné žlázy. Pokud je struma způsobena nedostatkem jódu, jedná se o endemickou strumu nazývanou kretenismus. Porucha se vyznačuje kongenitálním deficitem hormonů štítné žlázy. Symptomy nemoci jsou mentální retardace, problémy s motorikou, po porodu porucha růstu a pohlavního zrání [10].

3.3.2 Nadbytek jódu v organismu

Nadbytek jódu se projevuje patologicky zvýšenou činností štítné žlázy, nazývanou hypertyreóza neboli tyreotoxikóza. Tvoří se nadměrné množství hormonů T3 a T4. Příznaky nemoci jsou velmi individuální, nejčastějšími jsou únava, svalová slabost, nervozita, tepelná intolerance, poruchy spánku, nepravidelný srdeční rytmus, úbytek váhy či průjem. Předávkování jódem může nastat například po konzumaci potravinových doplňků obsahujících mořské řasy, po sirupu proti kašli s vysokým obsahem jódu nebo po lécích používajících se k léčbě srdečního selhání [11].

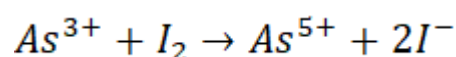
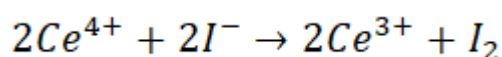
3.4 Metody stanovení jódu v biologické matrici

Jód je z 90 % vylučován močí (viz 3.2), proto jeho stanovení probíhá většinou právě v tomto biologickém materiálu. Stanovení jódu v moči je nezbytné pro monitorování příjmu jódu potravou. Jedná se o parametr, který poskytne informace o výživě populace a jejich vyhodnocením je možné porovnat výživové rozdíly například mezi jednotlivými státy [12]. Intervence jodováním soli je dobrá prevence a základ pro zlepšení situace při nízkých koncentracích jódu v moči v určité oblasti [13].

Metoda pro stanovení jódu v moči by měla být ideálně levná, rychlá, snadno použitelná, přístrojově dostupná, s malým množstvím toxického odpadu [12]. Vzorek by měl být indikátorem stavu jódu a důležitá je také jeho dostupnost. Všechna zmíněná kritéria moč splňuje – poskytuje dostatek vzorku pro analýzu a metoda odběru je neinvazivní [14].

Mezi nejčastěji používané metody patří **spektrofotometrická analýza založená na Sandellově-Kolthoffově reakci**. Při zmíněné reakci dochází k redukci žlutě zbarvených ceričitých iontů na bezbarvé cerité ionty. Reakce probíhá v prostředí kyseliny sírové za účasti arsenitých iontů a jodidových aniontů, které zde mají funkci katalyzátoru [15, 16]. Rychlost přeměny roztoku žluté barvy na bezbarvý roztok je dána množstvím přítomného jódu. Reakce je vyhodnocena změřením snížené absorpance vlivem ceričitých iontů. V případě přítomnosti více druhů látek absorbujících UV záření je reakce vyhodnocována emisí záření odpovídajícího pouze obsahu jódu [17]. Sandell-Kolthoffova reakce je znázorněna v rovnici 1.

Rovnice 1 Sandell-Kolthoffova reakce



Stanovení jódu předchází mineralizace vzorku, tedy odstranění organických látek, která se provádí silnou kyselinou nebo silně alkalickou látkou při vysoké teplotě.

Při práci s kyselinou chloristou je třeba dbát na bezpečnost a používat speciální odvzdušňovací metodu (digestoř) a vodní ochranu. Páry kyseliny chloristé jsou vysoce

výbušné. Další možností mineralizace je použití peroxidisíranu amonného. Toto činidlo je bezpečnější, nevýbušné, proto se k odstranění rušivých látek používá častěji. Reakce probíhá při teplotě 110 °C po dobu 60 minut. Následně se vzorky proběhne Sandell-Kolthoffova reakce při teplotě 25 °C [13].

Sandell-Kolthoffovu reakci lze automatizovat pomocí **průtokové injekční analýzy (FIA)**. Elementární jód reaguje se škrobem, přesněji řečeno s amylozou nebo amylopektinem a vytváří s nimi komplex modré barvy. Reakce je katalyzována přítomností jodidu [17]. Při metodě FIA je na digesci vzorku vhodné použít směs kyseliny sírové, manganistanu draselného a dichromanu draselného. Na konci analýzy nezreagované ceřičité ionty reagují s brucinem a vzniklý produkt se detekuje spektrofotometrem při vlnové délce 480 nm. Metoda je citlivá, přesná, jednoduchá a rychlá [18].

Na místo amylozy a amylopektinu lze jako činidlo pro stanovení elementárního jódu využít polyvinylalkohol, se kterým vytváří modrý produkt. Modrá barva je tím výraznější, čím vyšší je stupeň hydrolyzy polyvinylacetátu na alkohol.

Stanovení jódu metodou FIA lze provést také oxidací 4,4'-metylenbis(N,N-dimetyl)anilinu chloraminem T za vzniku modrého produktu, jehož absorbance se měří při vlnové délce 600 nm. Do systému je dávkován vzorek, 4,4'-metylenbis(N,N-dimetyl)anilin a chloramin T a následně vzniklý produkt putuje přes reakční cívku do detektoru. Jodid tady vystupuje jako katalyzátor reakce [17].

Instrumentální neutronová aktivační analýza (INAA) patří mezi druhou nejrozšířenější techniku pro stanovení jódu v potravinách a biologickém materiálu, přestože je málo dostupná. Vzorek moči je ozařován neutrony a je monitorována emise vytvořeného radioaktivního izotopu. Výhodou metody je, že vzorek není třeba předem upravovat [17].

V kravském mléce je jód stanovován pomocí **hmotnostní spektrometrie s indukčně vázanou plazmou (ICP-MS)**. V autoklávech jsou ze vzorku extrahovány sloučeniny jódu alkalickým činidlem TMAH (tetramethylamonium hydroxid). Odseparují se nerozpustné komponenty a roztok se zředí demineralizovanou vodou [16]. Peristaltickým čerpadlem je roztok vháněn do zmlžovací komory a vzniklý aerosol je vstřikován do

hořáku, kde je udržována argonová plazma o teplotě 6 000 - 8 000 K. Po atomizaci a ionizaci projde pouze malá část iontů do hmotnostního spektrometru. Ionty jódu jsou odděleny podle jejich poměru hmotnost/náboj a stanoveny detektorem záchytu elektronů. Výhodou je vysoká citlivost, nízké detekční limity, velký lineární rozsah, nevýhodou je častý výskyt interferencí a vysoká cena [16, 19].

Ke stanovení jódu v moči lze využít metodu **extrakce tuhou fází (SPE)** nebo **mikroextrakci tuhou fází (SPME)**. Při SPE dochází k přenosu analytů z kapalného vzorku na tuhý nosič neboli sorbent. K uvolnění zachycených látek dochází rozpouštědlem s vysokou eluční silou nebo méně často tepelnou desorpcí. Během analýzy se využívají membránové disky nebo kolonky naplněné sorbentem, kterým jsou nejčastěji organické polymery. Po eluci extrahovaného analytu dochází k jeho identifikaci a detekci pomocí plynové chromatografie s hmotnostním, plamenoionizačním detektorem nebo detektorem elektronového záchytu [20]. Pro eliminaci elučního kroku je možné provést detekci zachyceného analytu přímo na extrakčním disku naimpregnovaným reakčním činidlem, které reaguje s analytem za vzniku barevného komplexu. Ten se následně hodnotí difúzní reflexní spektroskopii [21]. Výhodou je velký výběr sorbentů, použitelnost pro těkavé, netěkavé, organické či anorganické látky, snadná automatizace a minimální vznik toxických látek. Při SPME je sorbent v tenké vrstvě potažen na křemičitém vlákne umístěném uvnitř kovové jehly [20].

Další způsob stanovení jódu v moči je **semikvantitativní metoda Fas B** nebo její modifikace. Stanovení jódu se provádí pomocí redoxního indikátoru ferroinu. Metoda je rychlá a instrumentálně jednoduchá, ale nedokáže stanovit přesnou hodnotu koncentrace, pouze její rozmezí. Modifikovaná metoda využívá persíran amonný [13].

3.5 Průtokové techniky

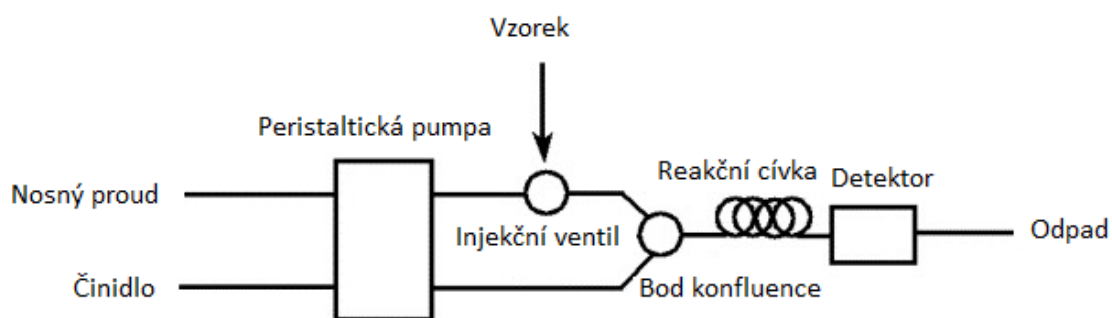
Průtokové techniky patří mezi neseparační metody, pro které je charakteristická rychlá analýza, automatická příprava vzorků, snadná manipulace s roztoky, miniaturizace, s tím spojená nízká spotřeba reagensů a vzniklého odpadu. Tato kritéria jsou důvodem, proč jsou průtokové techniky často využívány k rutinním a výzkumným analýzám ve farmaceutických laboratořích. Vzorek společně s reagensy je dávkován do nosného proudu, po proběhnutí chemické reakce je produkt vháněn do detektoru, nedochází k ustalování rovnováhy, signál detektoru je tedy nestacionární [22].

3.5.1 Průtoková injekční analýza

Systém průtokové injekční analýzy (Flow Injection Analysis – FIA) se skládá z několika kanálků, kdy každý kanál slouží pro jeden roztok. Kanály se v určitém bodě spojují a při průchodu vzorku dochází k reakci, při které vzniká produkt. Produkt je následně detekován v detekční cele umístěné na konci systému. Odezva detektoru ve formě píku je dána koncentračním gradientem vytvořeného produktu, který vzniká disperzí vzorku a nosného proudu. Nejčastěji se používají spektrofotometrické a elektrochemické detektory [23].

Nosný proud je ze zásobníku kontinuálně vháněn do systému spolu s dalšími činidly, což zajišťuje peristaltická pumpa. V analýze FIA se rychlost průtoku reagensů pohybuje okolo 0,5-2,5 ml/min. Vzorek je dávkován injekčním ventilem z dávkovací smyčky. V závislosti na délce smyčky je umožněno dávkování různého objemu vzorků, obvykle v rozmezí 5-200 μ l [23, 24]. Systém FIA je znázorněn na obrázku 1.

Metoda FIA umožňuje rychlou analýzu téměř neomezeného počtu vzorků a automatizaci jednoduchých barevných reakcí. Nevýhodou je pulzování toku roztoků přiváděných peristaltickou pumpou, čímž dochází k nejednotné průtokové rychlosti roztoků a tím k oscilaci signálu v detektoru [23].

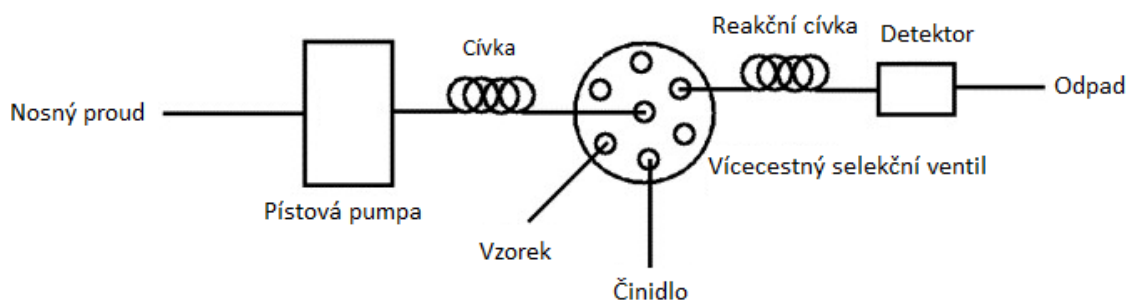


Obrázek 1 Schéma systému FIA [25]

3.5.2 Sekvenční injekční analýza

Sekvenční injekční analýza (Sequential Injection Analysis – SIA) odstranila nedokonalosti spojené s pulzujícím tokem reagentů v analýze FIA. Peristaltická pumpa byla nahrazena obousměrnou pístovou pumpou poháněnou přesným krokovým čerpadlem, čímž došlo k lepšímu promísení aspirujících činidel a tím k zvýšení přesnosti měření díky přesně dávkovaným objemům. Čerpadlo umožňuje vstřikování přesného objemu, nastavení variabilní průtokové rychlosti, libovolné pořadí a směr toku roztoků při aspiraci. Vzorky a roztoky jsou dávkovány přes vícecestný selekční ventil. Všechny roztoky putují přes centrální port do reakční cívky a detektoru, kde je signál vzniklého produktu vyhodnocován obdobně jako u analýzy FIA. Schéma analýzy SIA je zobrazeno na obrázku 2.

Výhodou metody SIA je nízká spotřeba vzorků, činidel a pokročilá automatizace díky ovládacímu program, ve kterém je možné snadno a rychle měnit parametry měření [25, 26].



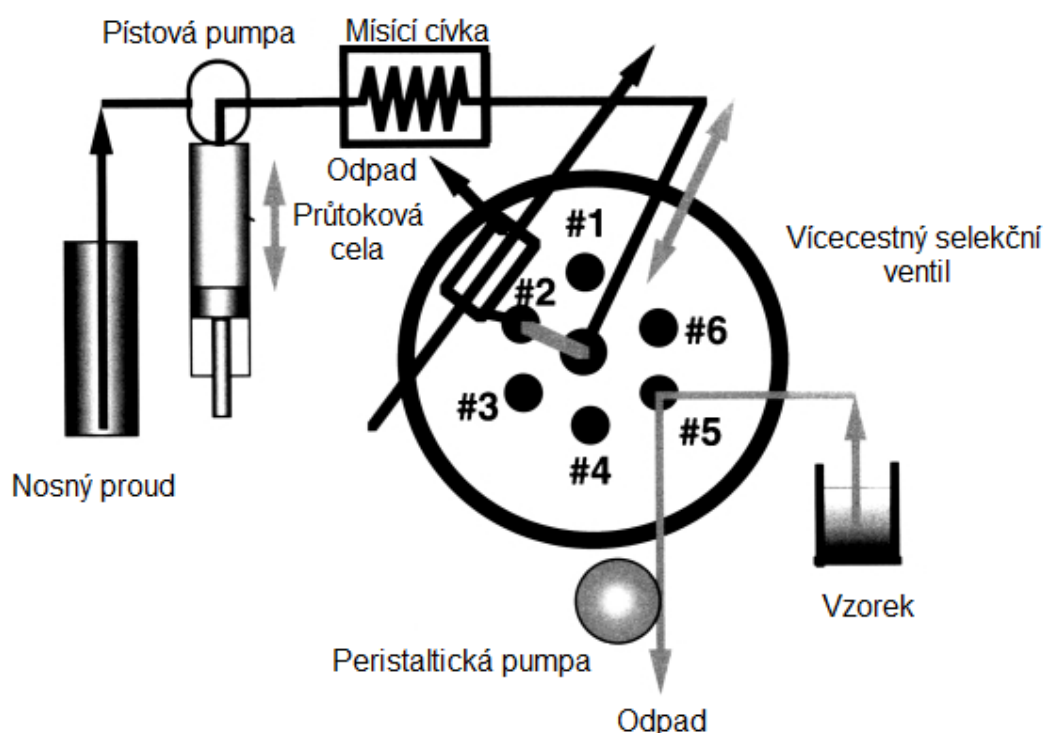
Obrázek 2 Schéma systému SIA [25]

3.5.3 Lab-On-Valve analýza

Lab-On-Valve (LOV) je modifikací metody SIA, u které proběhla rozsáhlá miniaturizace systému. Na selekčním ventilu je umístěn LOV modul, v němž jsou úzké kanálky. Součástí modulu je i průtoková detekční cela. Kanálky pro reakci mezi vzorkem, činidly a transportem do detektoru jsou velmi krátké. Pohyb a disperze roztoků jsou malé, přesto dochází k potřebnému mísení. Nosný proud přivádí pumpa, na kterou navazuje mísící cívka. Proces dávkování činidel a odvod odpadu je zajištěn nejčastěji přes šesticečný selekční ventil [27]. Případná pomocná peristaltická pumpa slouží k dávkování vzorku a důkladnému promytí systému. Produkt reakce vzniká během chemické reakce probíhající před průtokovou celou. V průtokové cele dochází k detekci signálu vznikajícího produktu pomocí optických vláken a optického detektoru [28, 29]. Systém LOV je znázorněn na obrázku 3.

Pokud požadovaná chemická reakce nestihne proběhnout před detekcí, analýza umožňuje zastavit tok přímo v detekční cele a tím sledovat reakční kinetiku [27, 28].

Výhodou metody LOV je snadná automatizace, urychlení analýzy, nižší spotřeba vzorku, činidel a tím také vzniklého odpadu [27, 29].

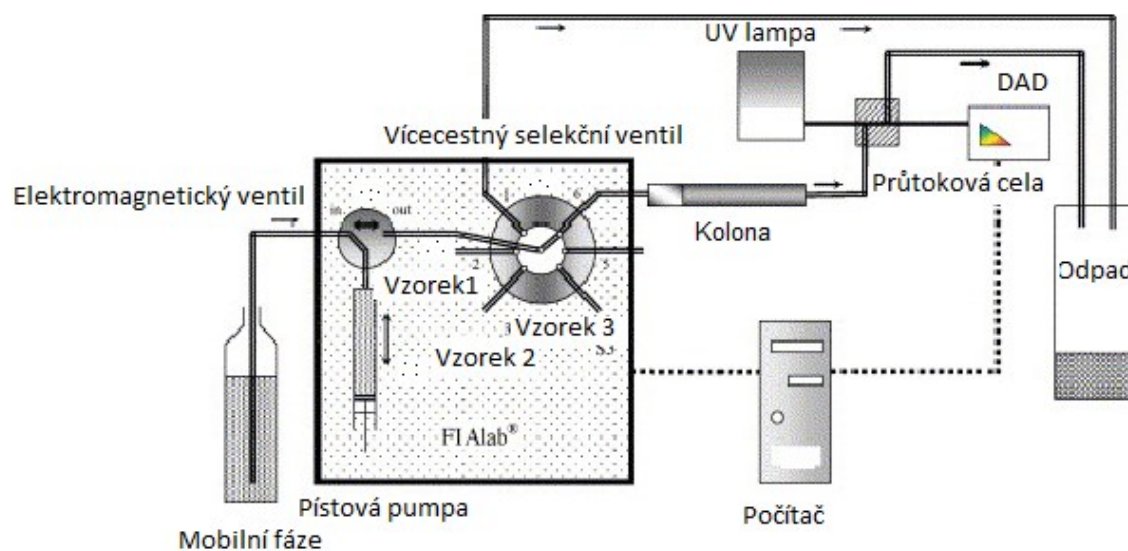


Obrázek 3 Schéma systému Lab-On-Valve [30]

3.5.4 Sekvenční injekční chromatografie

Sekvenční injekční chromatografie (Sequential Injection Chromatography – SIC) je metoda, která vznikla zapojením krátké monolitické chromatografické kolony do systému SIA. Monolitická kolona je tvořena jediným kusem polymerní, porézní silikagelové tyče vykazující vysokou odolnost a životnost. Kolona o délce 25-50 mm je umístěna mezi vícecestným selekčním ventilem a průtokovou celou detektoru, jak je uvedeno na obrázku 4. Pokroky v instrumentaci dnes umožňují i zapojení kolon s částicemi s pevným jádrem a porézním povrchem [31, 32].

Metoda je využívána pro rychlou separaci jednoduchých vícesložkových směsí. Vzorky se složitější matricí musí být předem upraveny, například extrakcí do organického rozpouštědla [31, 32].



Obrázek 4 Schéma systému SIC [32]

3.5.5 Lab-In-Syringe analýza

Lab-In-Syringe (LIS) se zaměřuje především na automatizaci jednotlivých kroků mikroextrakčních postupů. LIS se úspěšně používá pro mikroextrakci z kapaliny do kapaliny (LPME), disperzní mikroextrakci z kapaliny do kapalin (dispersive liquid-liquid microextraction – DLLME) a mikroextrakci do jediné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction – SDME) [33, 34].

Vzorky a činidla jsou dávkovány přes vícecestný selekční ventil přímo do rezervoáru pístové pumpy s magnetickým míchadlem zajišťujícím promísení roztoků a mohou zde probíhat i chemické reakce. Skleněná pístová pumpa může být otočena obráceně, což umožňuje použití i extrakčního rozpouštědla s vyšší hustotou než má voda, např. chloroformu. Roztoky jsou vedeny hadičkami vyrobenými z polytetrafluorethylenu (PTFE). Přes daný port vícecestného selekčního ventilu je reakční směs transportována do detekční cely spektrofotometrického detektoru s optickými vlákny a odezva detektoru je zaznamenávána v počítači [35]. Schéma systému LIS je znázorněno v kapitole 4.1.3.

Výhodou LIS je možnost manipulace s větším objemem vzorků, vysoký stupeň automatizace, online příprava vzorků a homogenní mísení aspirovaných roztoků [34].

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Popis metody a chemikálie

4.1.1 Použité chemikálie

Aktivní uhlí IMUNA PHARM, a. s, Šarišské Michaľany, Slovenská republika

Chlorid sodný PENTA, Chrudim, Česká republika

Chloroform PENTA, Chrudim, Česká republika

Destilovaná voda Millipore®, připravena na Katedře analytické chemie v Hradci Králové

Ethanol Sigma-Aldrich spol. s. r. o., Praha, Česká republika

Genciánová violeť Sigma-Aldrich spol. s. r. o., Praha, Česká republika

Hydroxid sodný PENTA, Chrudim, Česká republika

Jodičnan draselný Lachema, n. p., Brno, Česká republika

Jodid draselný Lachema, n. p., Brno, Česká republika

Kyselina chlorovodíková Sigma-Aldrich spol. s. r. o., Praha, Česká republika

Kyselina citronová, monohydrát Lach-Ner, s. r. o., Neratovice, Česká republika

Kyselina fosforečná PENTA, Chrudim, Česká republika

Kyselina sírová PENTA, Chrudim, Česká republika

Methanol Sigma-Aldrich spol. s. r. o., Praha, Česká republika

Isopropanol Sigma-Aldrich spol. s. r. o., Praha, Česká republika

Skelný uhlík Alfa Aesor®, A Johnson Matthey Company, Karlsruhe, Německo

Sorbent C18 LiChrolut® Rp-18 Merck, Praha, Česká republika

Sorbent Iontosorb TMAHP 100 IONTORORB®, Ústí nad Labem, Česká republika

4.1.2 Příprava roztoků

Příprava roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol/l

Na analytických vahách bylo naváženo 60 g chloridu sodného, který byl rozpuštěn v přibližně 120 ml destilované vody. Po rozpuštění byla 200 ml odměrná baňka doplněna po rysku destilovanou vodou.

Příprava roztoku chloridu sodného o koncentraci 0,05 mol/l

Z roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol/l byl zředěním připraven roztok o koncentraci 0,05 mol/l. Do odměrné baňky o objemu 200 ml bylo odebráno 20 ml chloridu sodného o koncentraci 5 mol/l a odměrná nádoba byla doplněna po rysku destilovanou vodou.

Příprava roztoku kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,8 mol/l a 0,4 mol/l

Skleněnou pipetou bylo odebráno 3,6 ml nebo 1,7 ml 35% kyseliny chlorovodíkové do 50 ml odměrné baňky, která byla z části naplněna destilovanou vodou. Po přidání kyseliny chlorovodíkové byla baňka doplněna destilovanou vodou po značku.

Příprava roztoku genciánové violeti o koncentraci 0,613 mmol/l (250 mg/l)

Genciánová violeť byla připravena podle Agrawal a spol. [36]. Na analytických vahách bylo naváženo 12,5 mg genciánové violeti, která se kvantitativně převedla do 50 ml odměrné baňky a dále bylo přidáno 150 μ l 85% kyseliny fosforečné. Destilovaná voda byla doplněna po rysku odměrné baňky a řádně se nechaly rozpustit krystalky navážené chemikálie. Připravený roztok pro analýzy byl uchováván v tmavé baňce, v ledničce při 4°C.

Příprava roztoku jodičnanu draselného o koncentraci 50 mmol/l

Pro přípravu zásobního roztoku bylo naváženo 1,07 g jodičnanu draselného. Navážené množství látky bylo kvantitativně převedeno do 100 ml odměrné baňky, nechalo se rozpustit v destilované vodě a baňka byla doplněna vodou po rysku.

Příprava roztoku jodičnanu draselného o koncentraci 5 mmol/l

Z připraveného roztoku o koncentraci 50 mmol/l bylo odebráno 5 ml do 50 ml odměrné baňky, která byla doplněna destilovanou vodou po značku.

Příprava roztoku jodidu draselného o koncentraci 6 mmol/l

Jodidu draselného bylo naváženo 100mg, dále byl rozpuštěn v destilované vodě a odměrná baňka o objemu 100 ml, do které byl převeden jodid draselný, se doplnila po její rysku. Připravený roztok sloužil jako zásobní, z kterého byly správným naředěním připraveny roztoky o požadované koncentraci 0,6 $\mu\text{mol/l}$, 1,2 $\mu\text{mol/l}$, 2,4 $\mu\text{mol/l}$, 6 $\mu\text{mol/l}$ používané v analýze.

Příprava pufru o pH 4,5 a koncentraci 0,3 mmol/l

Pro přípravu pufru o potřebné koncentraci bylo naváženo 2,88 g kyseliny citronové. Navážené množství bylo rozpuštěno v přibližně 40 ml destilované vody. K roztoku byl po kapkách přidáván hydroxid sodný 1 mol/l, dokud pH nedosáhlo odpovídající hodnoty 4,5. Roztok byl převeden do 50 ml odměrné baňky a doplněn vodou po rysku.

4.1.3 Přístrojové vybavení

Pístová skleněná pumpa (5 ml) Cavro XL, Tecan, San Jose, CA, USA s **magnetickým míchadlem**

9-cestný selekční ventil FIALab Instruments, Inc., Seattle, USA

6-cestný selekční ventil FIALab Instruments, Inc., Seattle, USA

Halogenová lampa Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA

Detektor USB 2000 Ocean Optics Inc., Dunedin, FL, USA s optickými vlákny

Detekční cela z teflonu o délce optické dráhy 10 cm

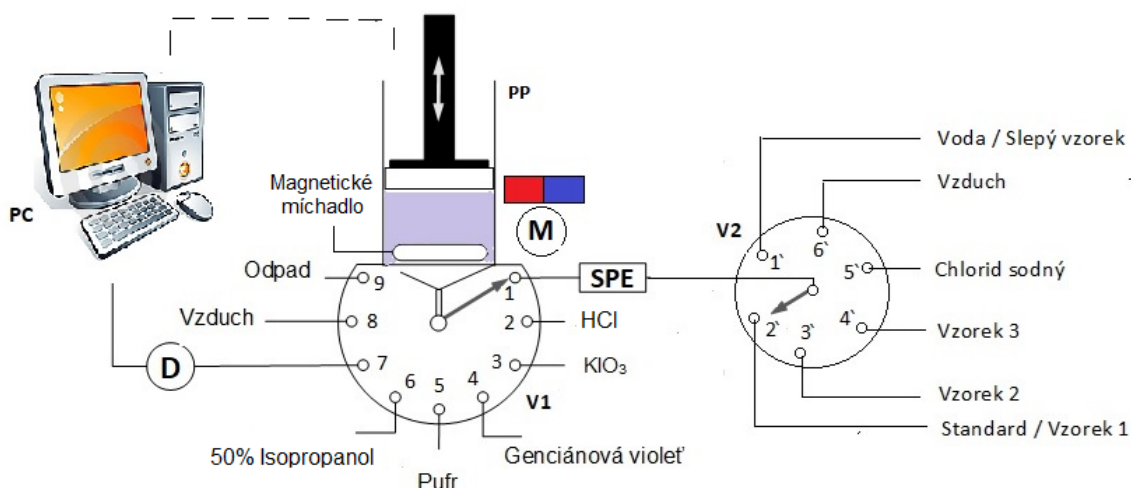
Extrakční PMMA (polymethylmetakrylát) kolona 10 x 5 mm

Magnet na motoru, který svojí rotací otáčí magnetické míchadlo uvnitř pístové skleněné pumpy

Motor z ventilátoru počítače

Software FIALab for windows 5.0

Použitý systém je zobrazen na obrázku 5.

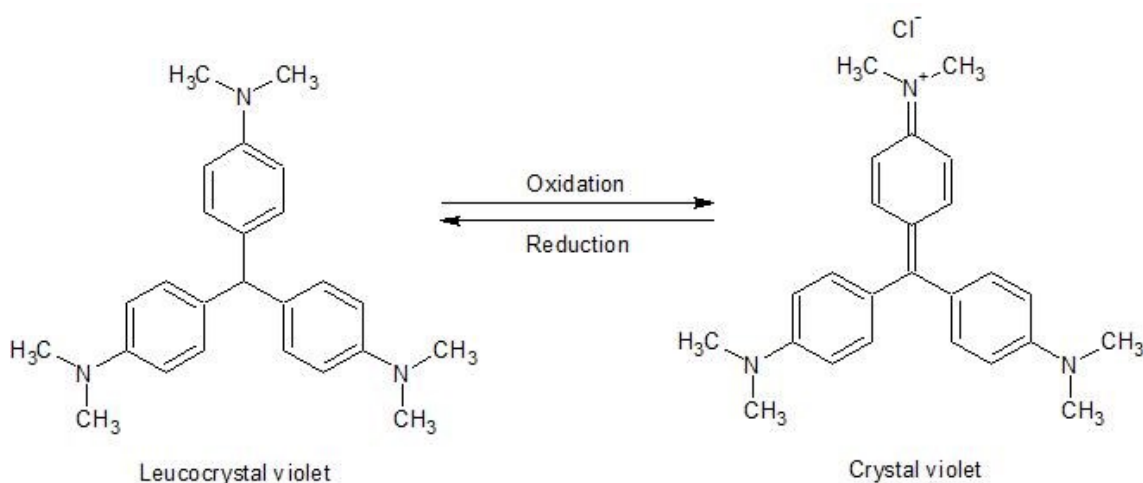


Obrázek 5 Schéma použitého měrného systému; D – Detektor, PC – Počítač, M – Motor s magnetem, V1 – 9-cestný selekční ventil, V2 – 6-cestný selekční ventil, SPE – Kolonka se sorbentem, PP – Pístová pumpa

4.1.4 Princip stanovení

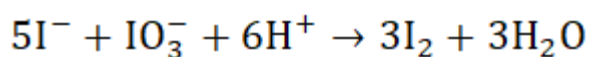
Použitá metoda je založena na selektivní oxidaci bezbarvé, genciánové violeti jódem na její barevnou formu. Vznik oxidované formy s maximem absorbance při 580 nm se projeví fialovou barvou. Barevnou genciánovou violetě je možné extrahovat do organického rozpouštědla. Oxidační reakce probíhá ideálně při pH 4,5 [37]. Jód potřebný ke zmíněné reakci vzniká oxidací jodidu oxidačním činidlem, kterým je v případě této diplomové práce jodičnan draselný. Přeměna jodidu probíhá v kyselém prostředí, které zajistila kyselina chlorovodíková. Tyto reakce využil ve své diplomové práci Mgr. Patrik Kušník [37], který pracoval s průtokovou technikou Lab-In-Syringe, kdy jsou vzorky aspirovány přímo do rezervoáru pístové pumpy. V uvedené metodě bylo aspirováno 3000 μl vzorku nebo slepého vzorku, 300 μl kyseliny chlorovodíkové, 100 μl oxidačního činidla jodičnanu draselného, 150 μl vzduchu, 600 μl pufru o pH 4,5, 100 μl genciánové violeti jako indikátoru reakce a 150 μl chloroformu. Extrakcí oxidované formy violeti do chloroformu jako organického rozpouštědla došlo k jejímu zakoncentrování a zvýšení citlivosti metody. Následně se měřila absorbance při vlnové délce 580 nm v detekční cele s optickou dráhou 1 cm.

Oxidační reakce genciánové violeti a jodidu jsou znázorněny na obrázku 6 a v rovnici 2.



Obrázek 6 Oxidace genciánové violeti

Rovnice 2 Oxidace jodidu na jód



Výchozí podmínky byly převzaty z diplomové práce Mgr. Patrika Kušníra [37]. Jedním z cílů této práce byla úprava metody tak, aby bylo možné vynechat extrakční krok do organického rozpouštědla a zároveň zachovat citlivost metody. Chloroform je organické rozpouštědlo, které má velký vliv na centrální nervovou soustavu (CNS). Inhalace způsobuje závratě, ospalost, bolest hlavy, podráždění sliznice a očních spojivek, při chronické expozici dochází k poškození jater a ledvin. Při kontaktu s pokožkou se vyskytují vředy a vyrážka. V životním prostředí se v malých dávkách chloroform vyskytuje v pitné vodě, kam se dostává pravidelnou chlorací, jedná se o rizikový faktor pro vznik karcinomu jater a ledvin [38]. Chloroform má negativní vliv na lidský organismus a také životní prostředí a organismy v něm se vyskytující, proto je značnou výhodou chloroform při analýze nevyužívat. K zajištění dostatečné citlivosti metody i bez využití extrakce byla využita detekční cela s délkou optické dráhy 10 cm, na rozdíl od 1 cm cely použité v předchozí metodě. Zvýšení citlivosti metody při prodloužení optické dráhy vyplývá z Lambert-Beerova zákona, který říká, že absorbance závisí na koncentraci rozpuštěné látky, optické délce kyvety a molárním absorpčním koeficientu. Vztah vyplývající z Lambert-Beerova zákona je uveden v rovnici 3.

Rovnice 3 Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

A – Absorbance, ε - Molární absorpční koeficient [l/mol.cm], c – koncentrace měřené látky [mol/l], l – délka kyvety [cm]

4.1.5 Metoda

Optimalizovaný program je uveden v příloze č. 1. Před začátkem měření byl systém promytý 50% isopropanolem a vodou – jak oba ventily, tak pístová pumpa a detekční cela. Zároveň proběhla aktivace kolony aspirací 2 ml 5 M NaCl z portu č. 5` přes kolonku do pumpy a dále do odpadu. Port č. 1 v 9-cestném ventilu sloužil jako přívod pro vzorky z 6-cestného ventilu do pístové pumpy s magnetickým míchadlem, kde zároveň probíhala reakce. Propojení pumpy a přídatného ventilu bylo zajištěno přes kolonku naplněnou sorbentem, jak je znázorněno na obrázku 5. Typ sorbentu je popsán v kapitole 5.1. Nejdříve byla z portu č. 1` aspirována voda pro promytí kolony po předchozí analýze. Následně byl přes kolonku aspirován vzorek nebo standard jodidu draselného z portů č. 2` nebo 3`. V tomto kroku došlo k retenci jodidu na sorbentu. Opět byla aspirována voda z portu č. 1` a chlorid sodný z portu č. 5` jako promývací krok. V dalším kroku byl aspirován vzduch z portu č. 6` a následovalo vypuštění aspirovaných roztoků do odpadu. Po tomto kroku následovalo promytí pístové pumpy 50% isopropanolem a vodou. Dále byl zachycený jodid eluován roztokem NaCl z kolony do prostoru pístové pumpy. Z portu č. 6` byl přes kolonku aspirován vzduch, který sloužil k „dopravení“ celého objemu aspirovaného roztoku z hadičky do prostoru pístové pumpy. Pro zajištění kyselého prostředí pro oxidaci jodidu na jód proběhla aspirace kyseliny chlorovodíkové z portu č. 2. Následovala aspirace oxidačního činidla jodičnanu draselného z portu č. 3 a poté vzduchu z portu č. 8. Z portu č. 6 byl aspirován 50% isopropanol. Z portu č. 5 byl aspirován pufr o pH 4,5. Nyní mohla proběhnout oxidace genciánové violeti, která trvala 120 vteřin za pomoci rotujícího magnetického míchadla uvnitř pístové pumpy. Po uplynutí zmíněné doby byla zastavena rotace míchadla a směs byla nasměrována do detektoru, kde byla měřena absorbance při vlnové délce 580 nm.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Předběžné experimenty - Výběr sorbentu pro extrakci jodidu v manuálním provedení

Před použitím reálného vzorku (moč) v analytickém zařízení byla manuálně testována jeho nejvhodnější úprava, aby bylo odstraněno co nejvíc matrice a tudíž interferujících látek. Manuální test byl proveden tak, aby kopíroval metodu zmíněnou v kapitole 4.1.4 se standardy.

Do odměrných nádob byly odebrány 1 ml/3 ml reálného vzorku, bylo přidáno 100 μ l/300 μ l 0,8 mol/l kyseliny chlorovodíkové, 100 μ l/300 μ l 5 mmol/l jodičnanu draselného. Po 10 vteřinách následovalo přidání 200 μ l/600 μ l 3 mol/l pufru, aby vznikl roztok o pH 4,5, dále 100 μ l 0,613 mmol/l genciánové violeti, roztok byl třepán 60 vteřin. V posledním kroku bylo přidáno 150 μ l chloroformu a směs byla třepána 50 vteřin.

Testovanými sorbenty pro SPE byly aktivní uhlí, skelný uhlík, sorbent C18 a iontoměnič TMAHP 100. Všechny pokusy byly provedeny bez přídavku a s přídavkem známého množství a koncentrace standardu, tj. fortifikací. Výsledky byly porovnány se vzorkem bez úpravy, respektive po filtraci. Postup jednotlivých experimentů je uveden dále. Pro srovnání byl test proveden také s reálným vzorkem a zfiltrovaným vzorkem bez SPE, pro filtraci byl použit filtr PTFE s velikostí pórů 0,45 μ m. Stejným způsobem byl zpracován fortifikovaný vzorek bez a s filtrací o koncentraci 2,4 μ mol/l.

Skelný uhlík

K zfiltrovanému vzorku byl přidán skelný uhlík jako sorbent (0,1 g na 7 ml). Vzorek byl vložen do ultrazvuku na 3 minuty a poté byl centrifugován a zfiltrován přes filtrační papír. Postup byl proveden se vzorkem bez přídavku a s přídavkem KI o výsledné koncentraci 2,4 μ mol/l.

Aktivní uhlí

Moč byla smíchána s aktivním uhlím (0,01 g na 7 ml), byla provedena centrifugace (3000 otáček/3 minuty) na oddělení sorbentu a následovala filtrace pomocí filtračního papíru.

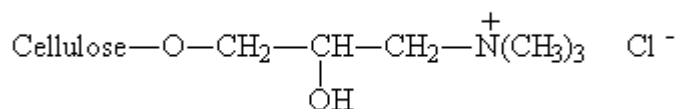
C 18

Kolonka naplněná sorbentem C18 (300 mg sorbentu v 3 ml kolonce) byla promytá 1 ml methanolu a 1 ml destilované vody k její aktivaci. Poté byly naneseny 3 ml reálného vzorku, které byly použity k reakci. Stejným způsobem byl připraven vzorek s koncentrací 2,4 $\mu\text{mol/l}$ jodidu draselného.

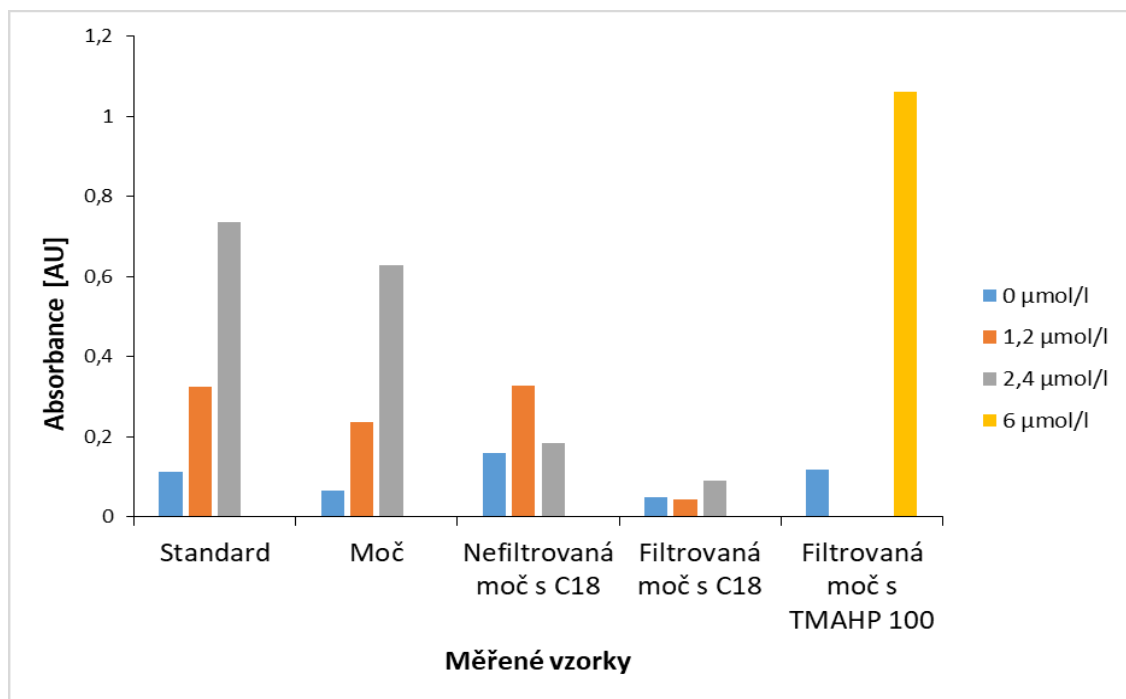
Iontosorb TMAHP 100

K zfiltrovanému vzorku byl přidán Iontosorb TMAHP 100 (0,4 g na 50 ml). Připravený roztok byl protřepán a poté byl sorbent oddělen filtrací pomocí filtračního papíru. Stejným způsobem byl připraven i vzorek s přidavkem standardu.

Veškeré úpravy byly prováděny v 5 ml odměrných, plastových nádobách za dodržení časových intervalů a objemů látek. Pokusy byly předběžné a výsledky byly hodnoceny jako vyhovující / nevyhovující. Vyhovující výsledek reakce byl zaznamenán u experimentu s kolonkou C18 a TMAHP 100, protože byl zřejmý rozdíl mezi samotným a fortifikovaným vzorkem. Na základě tohoto experimentu byly tyto sorbenty použity v průtokovém systému. Pro srovnání byl měřen také reálný vzorek bez úpravy. Vzorky byly měřeny bez přidavku jodidu draselného. Dále byly měřeny vzorky s přidavkem jodidu draselného o celkové koncentraci roztoků 1,2 $\mu\text{mol/l}$ a 2,4 $\mu\text{mol/l}$, vzorky s TMAHP 100 o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$. Objem aspirovaných vzorků byl 1 ml. Přehled průměrných hodnot absorbance u jednotlivých měření a jejich srovnání se standardem je uveden v grafu 1. Stavba sorbentu TMAHP 100 je znázorněna na obrázku 7.



Obrázek 7 Struktura Iontosorbu TMAHP 100 [39]



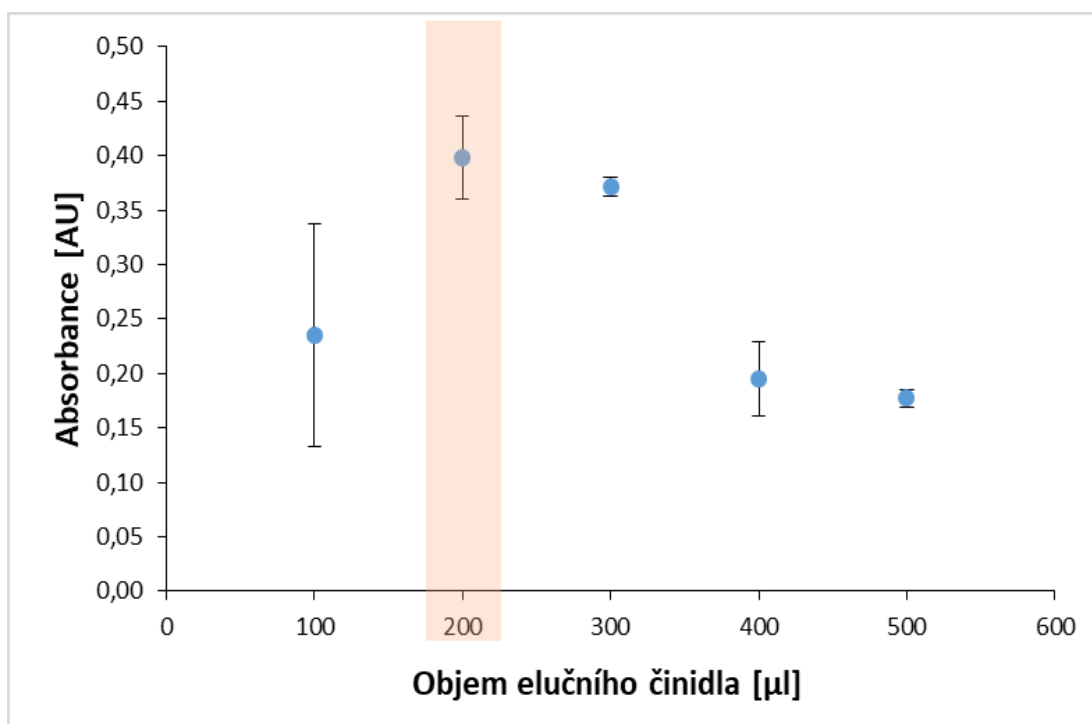
Graf 1 Srovnání absorbance reálných vzorků a fortifikovaných reálných vzorků se standardem

Na základě předběžných pokusů byl pro další testování vybrán sorbent Iontosorb TMAHP 100. Kolonka, která spojovala 6-cestný a 9-cestný selekční ventil o rozměrech 10 x 5 mm, byla naplněna 40 mg tohoto sorbentu. Iontosorb TMAHP 100 je silně zásaditý, aniontový iontoměnič, který zachytil pouze anionty jódu. Matrici ze vzorku by neměla být na tomto typu sorbentu zadržena, ale byla vypuštěna do odpadu a nemohla tak ovlivnit výsledky měření. Strukturou se jedná o hydrofilní, makroporézní celulózu s 3-trimetylamino-2-hydroxypropyl skupinou. Označení 100 představuje typ pórů vyskytujících se v celulóze. Výhodou sorbentu TMAHP 100 je vysoká chemická odolnost a kompatibilita s nejčastěji používanými rozpouštědly a pufrů. Sorbent je možné použít v širokém rozmezí pH a vyznačuje se vysokou selektivitou extrakce [39].

5.2 Optimalizace objemu elučního činidla chloridu sodného

Na eluci jodidu zachyceného na kolonce naplněné sorbentem TMAHP 100 byl použit chlorid sodný o koncentraci 5 mol/l [40]. Cílem tohoto experimentu bylo optimalizovat množství činidla. Chlorid sodný byl použitý v objemech 100 μl , 200 μl , 300 μl , 400 μl a 500 μl . Pokus byl proveden se standardem o koncentraci 0,6 $\mu\text{mol/l}$, aspirovalo se ho 1000 μl . Aspirovaná kyselina chlorovodíková měla objem 200 μl a koncentraci 0,8 mol/l. Objem oxidačního činidla jodičnanu draselného byl 300 μl a koncentrace 5 mmol/l. Potřebné pH 4,5 pro průběh reakce zajistil citrátový pufr o objemu 600 μl . Genciánová violeť byla použita o objemu 100 μl a koncentraci 0,613 mmol/l. Na promytí analytického systému byl použit 50% isopropanol.

Z grafu 2 vyplývá, že nejvhodnější objem chloridu sodného je 200 μl . Tento objem byl dostačující pro eluci jodidu zachyceného v kolonce a měřená absorbance byla při použitém množství elučního činidla nejvyšší. Při použití vyššího objemu NaCl se už víc jodidu neeluovalo, spíš se projevil efekt naředění.

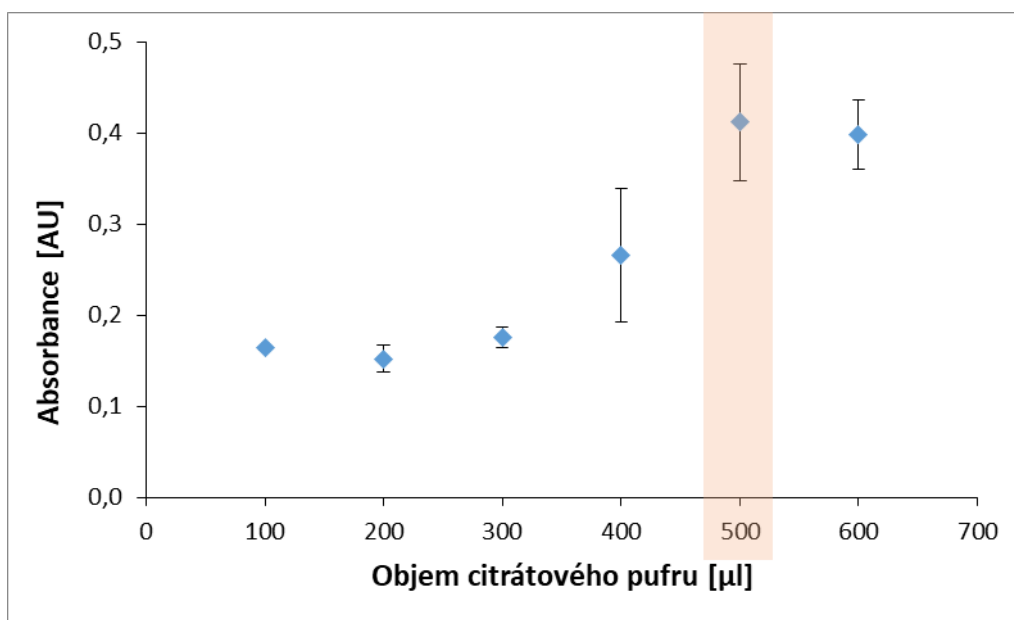


Graf 2 Závislost absorbance na objemu elučního činidla

5.3 Optimalizace objemu citrátového pufru

Cílem experimentu bylo najít vhodný objem pufru tak, aby pH po jeho přidání bylo optimální pro oxidaci genciánové violeti. Citrátový pufr byl použit o koncentraci 0,3 mmol/l, jehož pH bylo upraveno na hodnotu 4,5. Testovány byly objemy o hodnotách 100 μ l, 200 μ l, 300 μ l, 400 μ l, 500 μ l a 600 μ l. Měřený standard jodid draselný měl koncentraci 0,6 μ mol/l a aspirovaný objem 1000 μ l. Za eluční činidlo byl použit chlorid draselný 5 mol/l s dávkovaným objemem 200 μ l. Kyselé prostředí vytvořilo 200 μ l kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,8 mol/l. Jodičnan draselný představoval oxidační činidlo s koncentrací 5 mmol/l, aspirovaný objem byl 300 μ l. Genciánové violeti jako indikátoru reakce bylo použito 600 μ l o koncentraci 0,613 mmol/l. Roztok pro promytí systému byl 50% isopropanol.

Optimální objem citrátového pufru byl 500 μ l. Při vyšším objemu pufru se projevil efekt naředění barevného produktu. Nižší objemy pufru nestačily na vytvoření optimálního pH pro oxidaci leukokrystalové violeti na krystalovou, jak je patrné z grafu 3.



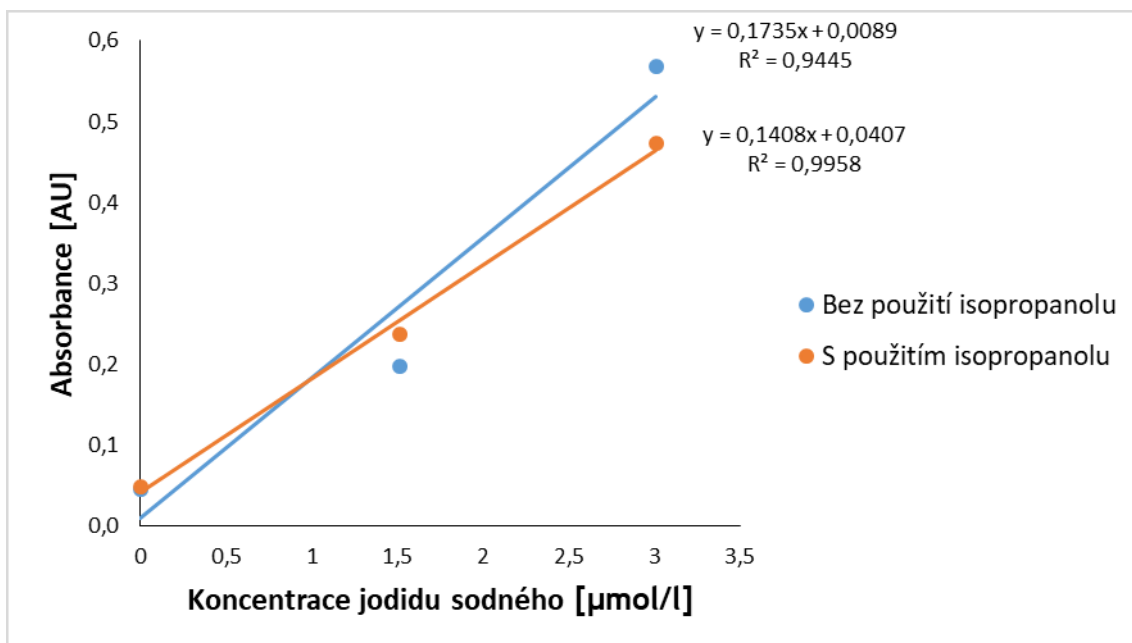
Graf 3 Závislost absorbance na použitém objemu pufru

5.4 Promytí systému isopropanolem

Cílem tohoto měření bylo ověřit potřebu promytí systému 50% isopropanolem. Oxidovaná, barevná forma genciánové violeti je extrahovatelná do chloroformu. Určitá část indikátoru může tedy ulpět na magnetickém míchadle pokrytém teflonem (hydrofobní materiál) umístěném uvnitř pístové pumpy. To se může projevit falešně nižší absorbcí při měření, případně ovlivnit měření dalšího vzorku. Testovaný parametr byl nezávislý na použití extrakční kolonky, proto byl pro ušetření času pokus proveden bez kolonky. Slepý roztok jako i standard o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ byly připraveny v roztoku elučního činidla, aby se simulovala situace eluce. Čerpaná kyselina chlorovodíková měla koncentraci 0,8 mol/l a objem 200 μl . Oxidační činidlo jodičnan draselný byl použit o koncentraci 5 mol/l a objemu 300 μl . Koncentrace pufru byla 0,3 mol/l a nasáván byl v množství 500 μl . Genciánová violeť byla aspirována v množství 100 μl a o koncentraci 0,613 mmol/l.

Standard o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ byl on-line naředěn, tj. při měření nižší koncentrace se aspiroval poloviční objem standardu a zbytek rozpouštědla (NaCl z důvodu imitování měření s použitím sorbentu a eluce). Absorbance byla měřena u slepého roztoku, 250 μl standardu a 500 μl standardu. V dalším měření byla absorbance hodnocena u totožných roztoků s přídatkem 200 μl isopropanolu.

Z grafu 4 je zřejmý rozdíl při měření s a bez aspirace isopropanolu. Přídatkem 50% isopropanolu měl za výsledek vyšší hodnotu korelačního koeficientu (R^2), která vyjadřuje míru linearitu dvou proměnných. Měření absorbance bez isopropanolu bylo zatíženo chybou, kterou pravděpodobně způsobilo zachycení indikátoru na hydrofobním povrchu částí pístové pumpy.



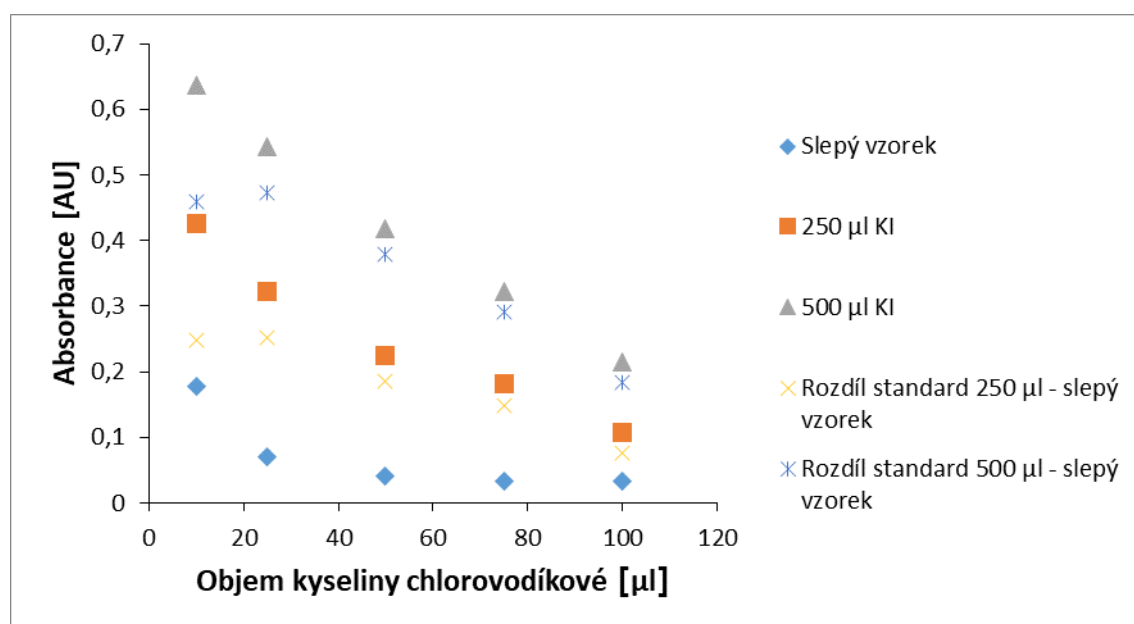
Graf 4 Závislost absorbance na koncentraci jodidu draselného a na použití isopropanolu

5.5 Optimalizace objemu kyseliny chlorovodíkové

Kyselina chlorovodíková vytváří v měrném systému kyselé prostředí, které je důležité pro průběh oxidační přeměny jodidu na jód. Množství zajišťující dostatečnou kyselost prostředí bylo zkoumáno v tomto měření. Kyselina chlorovodíková byla použita o koncentraci 0,8 mol/l a zkoušenými objemy byly 10 μ l, 25 μ l, 50 μ l, 75 μ l a 100 μ l. Aspirace těchto objemů odpovídala celkovému pH 1,8; 1,4; 1,1; 0,9 a 0,8. Slepý roztok a standard jodid draselný o koncentraci 6 μ mol/l byly připraveny v roztoku elučního činidla. Oxidační činidlo jodičnan draselný byl nasáván o objemu 300 μ l a koncentraci 5 mmol/l. Citrátový pufr byl do systému načerpán v množství 600 μ l. Genciánové violeti bylo použito 100 μ l o koncentraci 0,613 mmol/l.

Měření bylo provedeno se slepým roztokem, 250 μ l a 500 μ l standardu o koncentraci 6 μ mol/l. V tomto stanovení nebyla použita kolonka naplněná sorbentem TMAHP 100. Výsledky měření jsou znázorněny v grafu 5.

Z výsledků vyplývá, že nejvhodnější objem kyseliny chlorovodíkové je 25 μ l, což odpovídá pH 1,4. Při tomto objemu byla absorbance standardů po odečtení absorbance slepého vzorku nejvyšší. Objem 10 μ l nebyl zvolen z důvodu rizika objemové chyby při aspiraci.

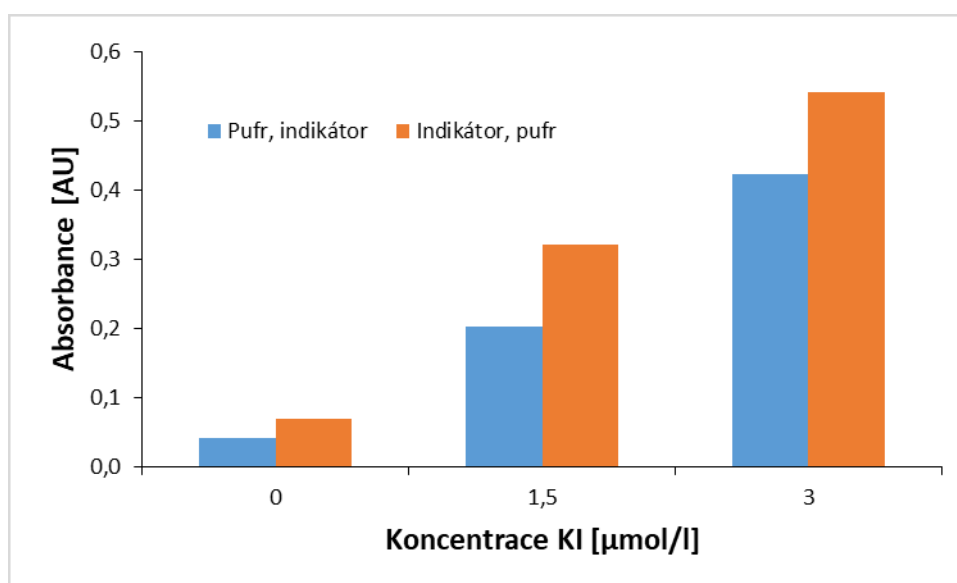


Graf 5 Závislost absorbance na použitém objemu kyseliny chlorovodíkové

5.6 Vhodné pořadí aspirace indikátoru a pufru

Cílem měření bylo ověřit, zda pořadí aspirace genciánové violeti a pufru má vliv na hodnoty absorbance. Měření probíhalo bez použití kolonky, protože test byl nezávislý na retenci jodidu. Aby podmínky odpovídaly použití extrakční kolonky, jako slepý roztok byl použit chlorid sodný o koncentraci 5 mmol/l (eluční činidlo). Standard jodid draselný o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ byl připraven v chloridu sodném, s aspirovaným objemem 1000 μl . Do systému byla čerpána kyselina chlorovodíková, jejíž koncentrace byla 8 mol/l a objem 200 μl . Koncentrace jodičnanu draselného měla hodnotu 5 mmol/l a objem 300 μl . Citrátový pufr byl čerpán v množství 500 μl a genciánová violeť 100 μl .

Test byl proveden s 500 μl standardu o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ a poloviční koncentrací připravenou on-line ředěním. Z grafu 6 vyplývá, že výhodnější je aspirovat nejprve indikátor genciánovou violeť (100 μl) a poté do systému aspirovat citrátový pufr. Při tomto pořadí aspirace chemikálií nabývá absorbance vyšších hodnot. Aspirace malého objemu barveného činidla není zatížena objemovou chybou. Případný rozdíl ve skutečně aspirovaném objemu pufru se při měření neprojeví, protože případná relativní chyba je vzhledem k objemu 500 μl pufru malá.

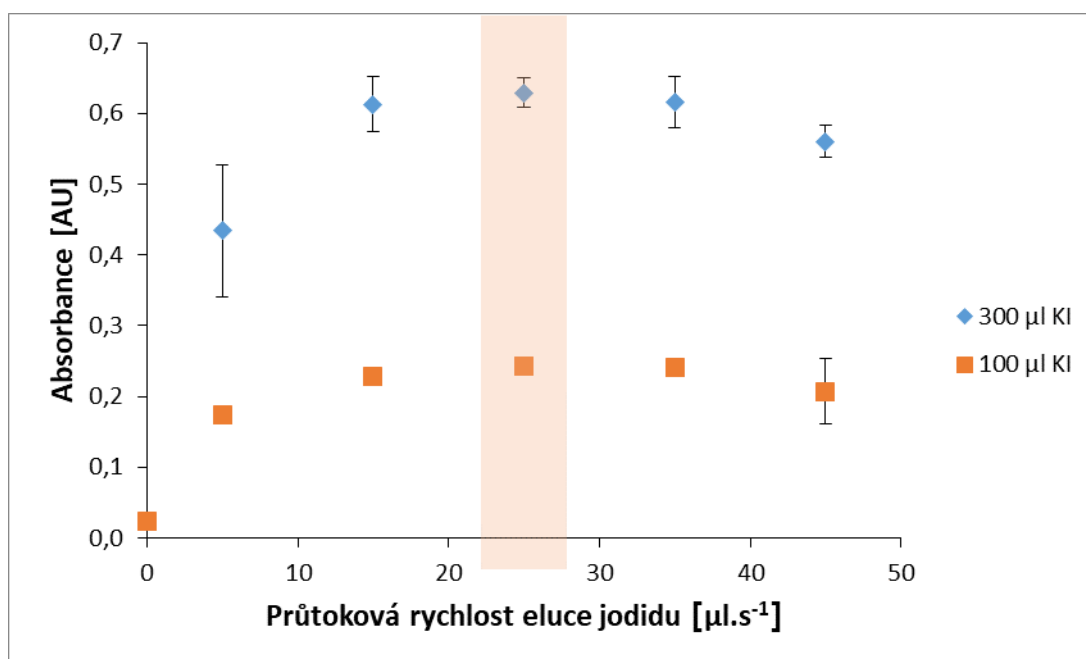


Graf 6 Srovnání hodnot absorbance při měření s různým pořadím aspirace genciánové violeti a citrátového pufru

5.7 Optimalizace průtokové rychlosti eluce jodidu

Při hledání optimální průtokové rychlosti eluce jodidu z kolonky chloridem sodným bylo aspirováno 500 μl této chemikálie. Zkoumanými průtokovými rychlostmi byly 5 $\mu\text{l/s}$, 15 $\mu\text{l/s}$, 25 $\mu\text{l/s}$, 35 $\mu\text{l/s}$ a 45 $\mu\text{l/s}$. Standard jodid draselný byl připraven o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ a aspirován o objemu 100 μl a 300 μl . Kyselina chlorovodíková měla koncentraci 0,4 mol/l a do pístové pumpy byla vháněna v množství 200 μl . Oxidační činidlo jodičnan sodný byl aspirován o objemu 300 μl a koncentraci 5 mmol/l. Citrátový pufr byl aplikován o objemu 500 μl a genciánová violeť o objemu 100 μl a koncentraci 0,613 mmol/l. V tomto měření byla použita kolonka naplněná sorbentem TMAHP 100.

Z naměřených hodnot absorbance, které byly získány při měření, vyplývá, že nejvhodnější průtoková rychlost aspirace chloridu sodného je 25 $\mu\text{l/s}$. Při této průtokové rychlosti byla naměřena nejvyšší absorbance a nejnižší odchylka měření. Výsledek měření je znázorněn v grafu 7.

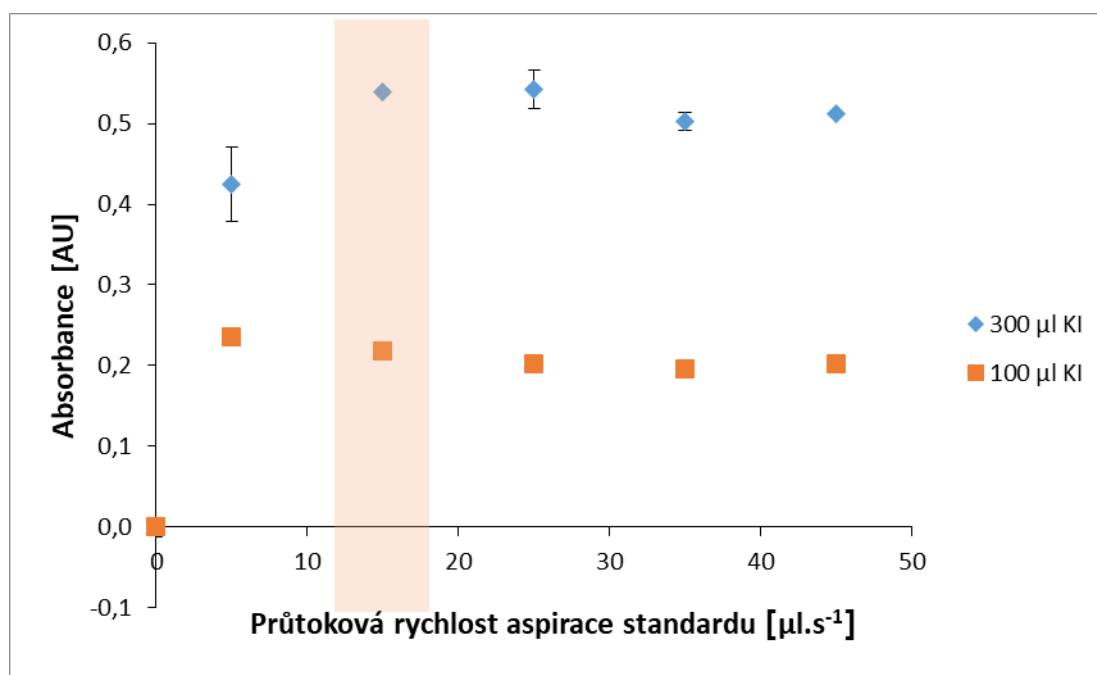


Graf 7 Závislost absorbance na průtokové rychlosti aspirace chloridu sodného

5.8 Optimalizace průtokové rychlosti aspirace standardu

Cílem experimentu bylo ověřit vliv průtokové rychlosti nanášení vzorku na retenci analytu. Standard byl aspirován o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ a objemech 100 μl , 300 μl . Hodnoty zkoumaných průtokových rychlostí byly 5 $\mu\text{l/s}$, 15 $\mu\text{l/s}$, 25 $\mu\text{l/s}$, 35 $\mu\text{l/s}$ a 45 $\mu\text{l/s}$. Chlorid sodný jako eluční činidlo byl čerpán o objemu 500 μl . Kyselina chlorovodíková zajišťující kyselé prostředí byla aspirována v množství 200 μl a o koncentraci 0,4 mol/l. Jodičnan draselný byl nasát v množství 300 μl , koncentraci 5 mmol/l. Citrátový pufr byl aspirován o objemu 500 μl a genciánová violeť o objemu 100 μl .

Dle výsledků měření byla nejpříjemnější průtoková rychlost aspirace standardu 15 $\mu\text{l/s}$, kdy měřená absorbance měla nejvyšší hodnotu a nejnížší směrodatnou odchylku. Se zvyšující se průtokovou rychlostí byl pozorován spíše její mírný pokles. Přehled výsledků je uveden v grafu 8.



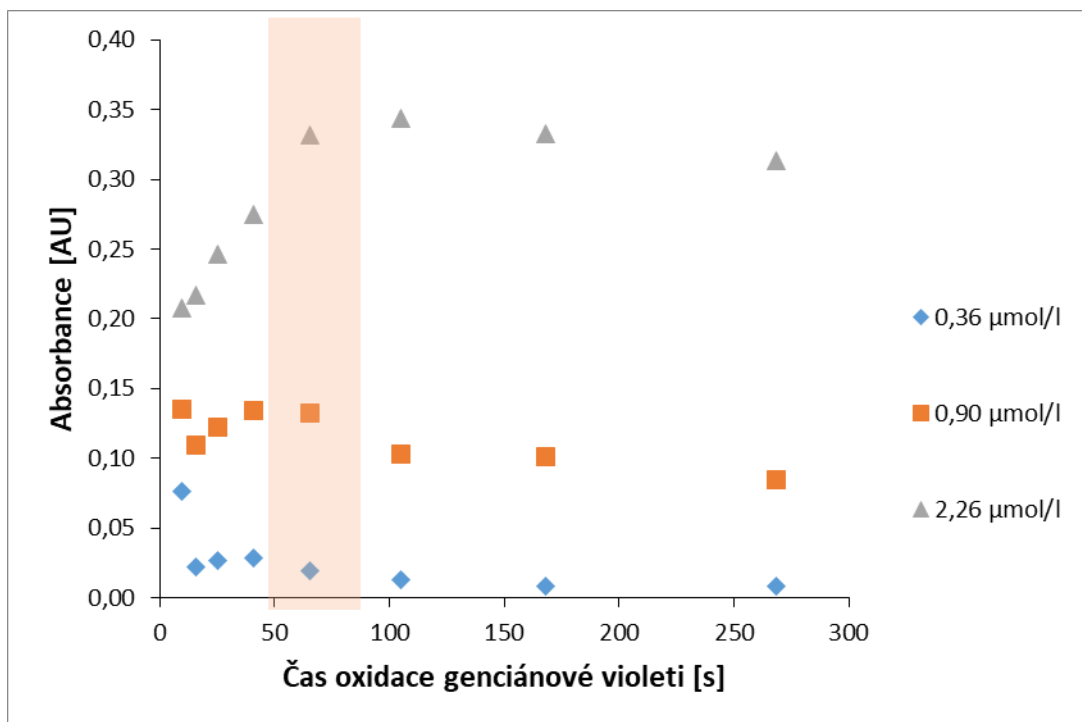
Graf 8 Závislost absorbance na průtokové rychlosti aspirace standardu

5.9 Optimalizace času oxidace genciánové violeti

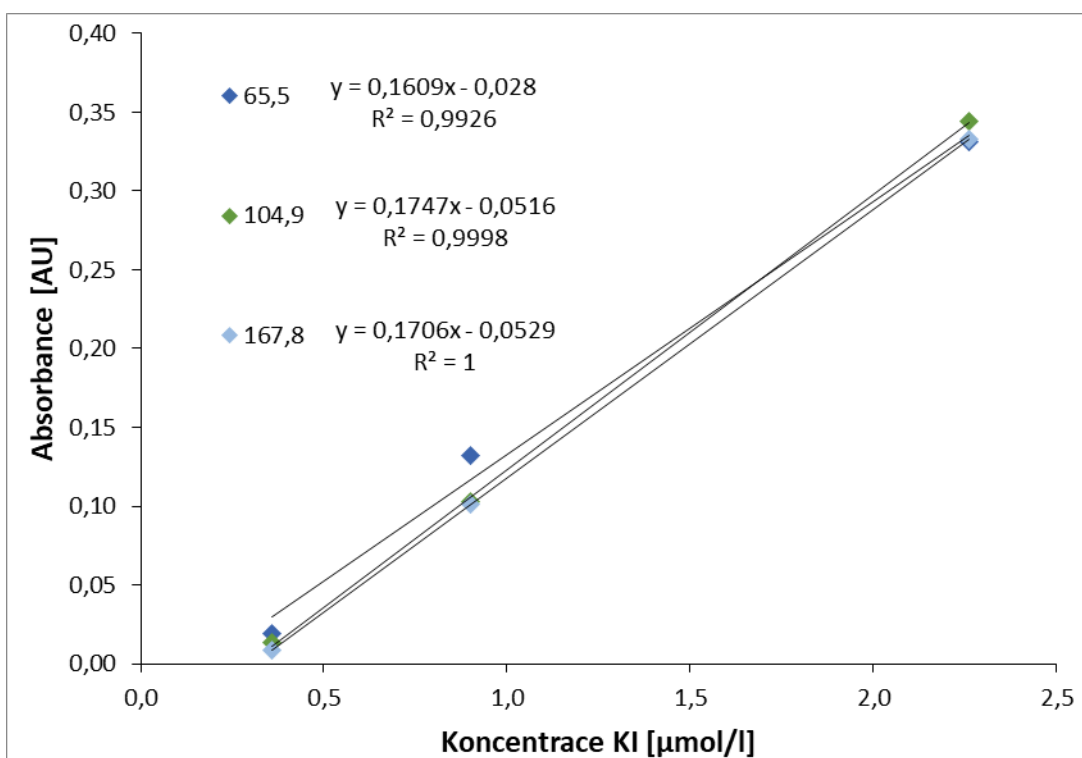
Oxidace bezbarvé formy genciánové violeti na barevnou formu není okamžitá. Agrawal a spol. [36] využívají na kompletní oxidaci 25 min. Průtokové metody umožňují díky přesnému časování jednotlivých kroků měření před dosažením rovnováhy. Cílem tohoto experimentu bylo najít čas, který umožní spolehlivé a dostatečně citlivé měření. Zkoušenými časy oxidace byly 10, 16, 25,6, 41, 65,5, 104,9, 167,8 a 268,4 vteřin. Standard byl připraven o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$, připraven v roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol/l. Použitá kyselina chlorovodíková měla hodnotu koncentrace 0,4 mol/l a objem 50 μl . Jodičnan draselný, použitý jako oxidační činidlo, byl aspirován o objemu 300 μl a koncentraci 5 mmol/l. Citrátového pufru o pH 4,5 potřebného k oxidační reakci genciánové violeti bylo nasáto 500 μl . Genciánová violeť byla aspirována o koncentraci 0,613 mmol/l a objemu 100 μl . Promytí systému bylo zajištěno 50% isopropanolem. Měření probíhalo bez kolonky naplněné sorbentem TMAHP 100.

Měření absorbance proběhlo s koncentracemi 0,36 $\mu\text{mol/l}$ (60 ppb), 0,90 $\mu\text{mol/l}$ (150 ppb) a 2,26 $\mu\text{mol/l}$ (375 ppb). Vzorke standardu byly připraveny metodou on-line naředění vzorků. Naředění jodidu draselného o požadované koncentraci chloridem sodným proběhlo uvnitř pístové pumpy během probíhající metody. Tímto způsobem se odstranila nutnost manuální přípravy vzorků.

Z měření bylo zjištěno, že nejvyšší absorbance je dosaženo po 65,5 vteřinách pro koncentraci 0,90 $\mu\text{mol/l}$, v případě koncentrace 2,26 $\mu\text{mol/l}$ to bylo při čase 104 vteřin. Vynesením závislosti absorbance na koncentraci standardu však bylo zjištěno, že tato závislost se nejvíce přibližuje přímce při použití času oxidace 104,9 vteřin a 167,8 vteřin, hodnoty R^2 byly 0,999 a 1, proto pro další měření byl vybrán čas oxidace genciánové violeti 120 vteřin. Přehled zkoušených časů oxidace a naměřené absorbance je v grafu 9, v grafu 10 je znázorněna závislost absorbance na koncentraci jodidu při různém čase oxidace genciánové violeti.



Graf 9 Závislost absorbance na čase oxidace genciánové violeti



Graf 10 Závislost absorbance na koncentraci jodidu draselného při různých časech oxidace genciánové violeti

5.10 Analytické parametry metody

Kalibrační křivka vyjadřuje linearitu metody a zobrazuje závislost měřené absorbance na koncentraci standardu. Podmínky pro měření kalibrační křivky byly zvolené na základě výsledků jednotlivých kroků optimalizace, které jsou uvedeny v předchozích kapitolách. Kalibrační závislost byla měřena pomocí šesti roztoků standardu s koncentracemi 0; 0,3; 0,6; 0,9; 1,2; 1,5; 1,8 $\mu\text{mol/l}$ (0, 50, 100, 150, 200, 250 a 300 ppb) při oxidačním čase genciánové violeti 100 vteřin a pomocí orientačních čtyř roztoků standardu s koncentracemi 0; 0,6; 1,2; 1,8 $\mu\text{mol/l}$ (0, 100, 200 a 300 ppb) při oxidačním čase 120 vteřin. Roztoky standardů o různých koncentracích byly připraveny on-line naředěním standardu o koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ elučním činidlem. Podmínky měření kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2 Podmínky při měření kalibrační křivky

Úloha chemikálií	Použitá chemikálie	Koncentrace	Objem [μl]
Standard	Jodid draselný	0 – 1,8 $\mu\text{mol/l}$	500
Oxidační činidlo	Jodičnan draselný	5 mmol/l	300
Činidlo pro kyselé prostředí	Kyselina chlorovodíková	0,4 mol/l	50
Eluční činidlo	Chlorid sodný	5 mol/l	500
Indikátor reakce	Genciánová violet	0,613 mmol/l	100
Činidlo zajišťující pH 4,5	Citrátový pufr	0,3 mol/l	500
Roztok na promytí	Isopropanol	50%	200

Při optimalizaci objemu kyseliny chlorovodíkové (viz 5.5) se dospělo k závěru, že nevhodnější množství zajišťující kyselé prostředí je 25 μl při koncentraci kyseliny 0,8 mol/l. V měření kalibrační křivky byl použit objem 50 μl pro zajištění opakovatelnosti aspirovaného objemu, proto byla koncentrace HCl snížena na odpovídající koncentraci 0,4 mol/l. Měření proběhlo bez zapojení extrakční kolony do systému. Hodnoty absorbance byly porovnány se slepým roztokem. Výsledky absorbance jsou uvedeny v tabulce 3 a přehled měření je zobrazen v grafu 11.

Tabulka 3 Hodnoty naměřené absorpance při oxidačním čase genciánové violeti 100 vteřin a aspirovaném objemu standardu 500 μ l.

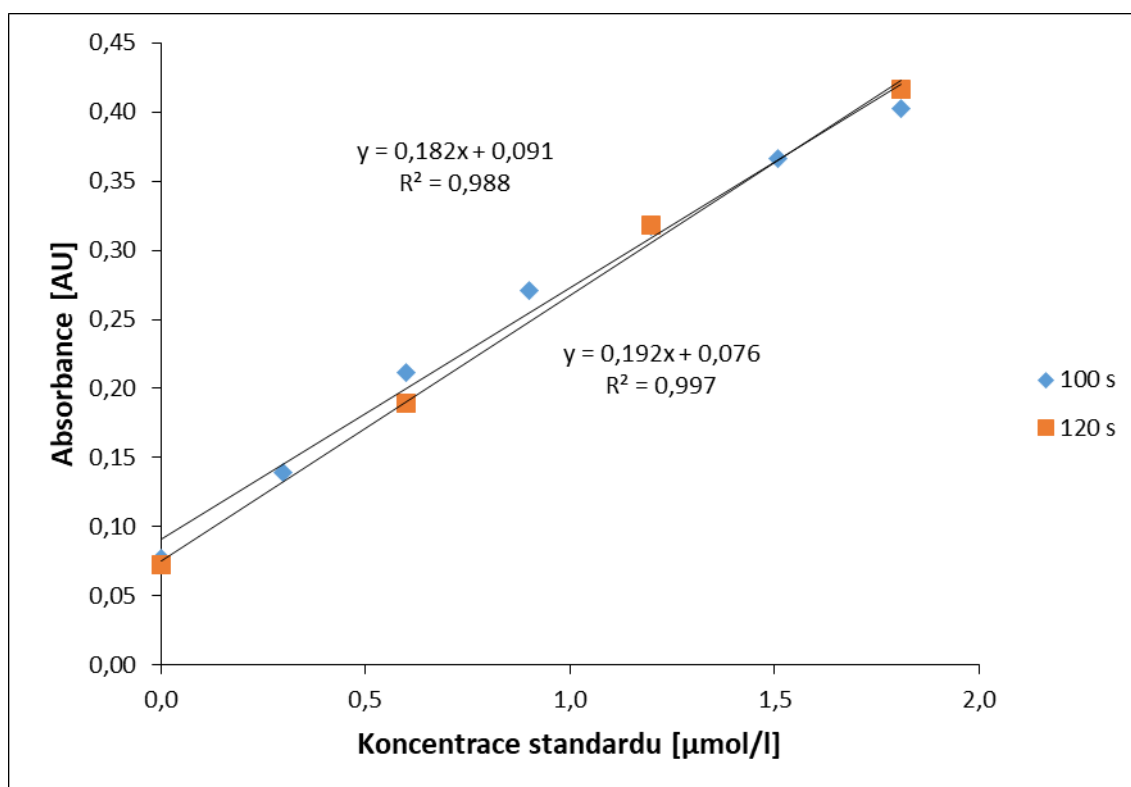
Koncentrace standardu [μ mol/l]	0	0,3	0,6	0,9	1,2	1,5	1,8
1. měření	0,075	0,138	0,207	0,269	0,318	0,376	0,404
2. měření	0,079	0,139	0,216	0,272	0,315	0,361	0,401
3. měření	0,079	0,14	0,213	0,271	0,319	0,363	-
průměr	0,078	0,139	0,212	0,271	0,317	0,367	0,403
SD*	0,002	0,001	0,005	0,002	0,002	0,008	0,002
RSD* (%)	3,0	0,7	2,2	0,6	0,7	2,2	0,5
rozdíl (Ast - Abl)*		0,061	0,134	0,193	0,239	0,289	0,325

*SD = Směrodatná odchylka

* RSD = Relativní směrodatná odchylka

* (Ast – Abl) = Absorbance standardu – Absorbance slepého roztoku

- = Chyba měření



Graf 11 Kalibrační křivka

Čím strmější bude kalibrační křivka a odezva detektoru větší, tím bude daná metoda citlivější [41].

Korelace vyjadřuje statistickou závislost mezi dvěma veličinami, v tomto případě mezi absorbancí a koncentrací standardu. **Korelační koeficient (R^2)** představuje těsnost mezi výsledky a nabývá hodnot od -1 – +1. Pokud je hodnota $R^2 > 0,9$, jedná se o dobrou korelaci [41]. Hodnota R^2 při čase oxidace 100 vteřin genciánové violeti byla 0,988, při čase oxidace 120 vteřin 0,997. Korelační koeficient je pro čas 120 vteřin vyšší, avšak opakovatelnost byla v tomto případě horší (viz 5.10 - Opakovatelnost), proto při měření kalibrační křivky se čtyřmi vzorky lze hodnotit výsledek pouze orientačně.

Lineární regrese je metoda, při které dojde k proložení několika bodů přímkou. Regresní analýzou lineární závislosti lze stanovit směrnici kalibrační křivky, která určuje citlivost analýzy [42]. Směrnice křivky byla 0,182 AU.L. μmol^{-1} v případě měření kalibračních roztoků při čase oxidace 100 vteřin a 0,192 AU.L. μmol^{-1} při čase oxidace 120 vteřin. (viz graf 11). Obecná rovnice lineární regrese je uvedena v rovnici 4 a rovnice lineární regrese pro čas oxidace 100 a 120 vteřin v grafu 11.

Rovnice 4 Obecná rovnice lineární regrese

$$y = a + bx$$

- y Hodnota absorbance
- a Posun na ose y
- b Směrnice, sklon regresní křivky
- x Hodnota koncentrace

Limit detekce (LOD) neboli mez detekovatelnosti je definována jako nejnižší koncentrace analytu, kterou je možné danou metodou prokázat a kterou lze bezpečně odlišit od přístrojového šumu. Tento parametr vyjadřuje citlivost metody [41]. Teoretická hodnota limitu detekce byla spočítána podle rovnice 5. Při oxidačním čase genciánové violeti 100 vteřin byl limit detekce 0,033 $\mu\text{mol/l}$ (5,45 $\mu\text{g/l}$) a při čase oxidace 120 vteřin 0,078 $\mu\text{mol/l}$ (13,64 $\mu\text{g/l}$). Hodnota LOD je nižší než LOD hodnoty většiny průtokových metod popsány např. v review od autorů Sherlor a Dasqupta [17], kde se hodnoty pohybují od 0,05 po 500 $\mu\text{g/l}$.

Rovnice 5 Výpočet limitu detekce

$$\text{LOD} = \frac{3 \times \text{sm. odchylka slepého vzorku}}{\text{směrnice přímky}}$$

Limit kvantifikace (LOQ) neboli mez stanovitelnosti charakterizuje citlivost metody. Představuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze stanovit s přijatelnou přesností a správností. Parametr je určován jako koncentrace, při jejímž měření relativní směrodatná odchylka nedosáhne 10 procent, jedná se o trojnásobek limitu detekce. LOQ je také možné formulovat jako koncentraci, která má hodnotu poměru signálu a šumu 10 [42]. Teoretická hodnota limitu kvantifikace byla vypočítána dle rovnice 6. Při měření absorbance za podmínek oxidace genciánové violeti 100 vteřin byl limit kvantifikace 0,099 $\mu\text{mol/l}$ a za podmínek oxidace 120 vteřin 0,234 $\mu\text{mol/l}$.

Rovnice 6 Výpočet limitu kvantifikace

$$\text{LOQ} = 3 \times \text{LOD}$$

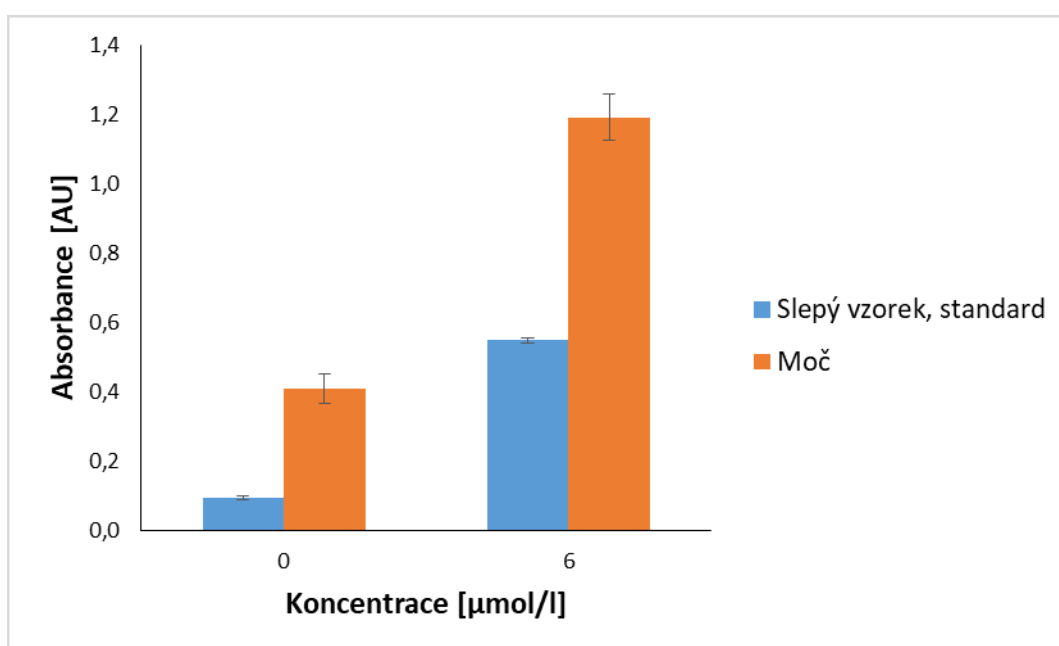
Opakovatelnost (% RSD) patří mezi základní parametry, které charakterizují přesnost měření, jedná se o odchylku naměřené hodnoty při vícenásobném měření. Opakovatelnost se testuje při totožných analytických podmínkách [41]. Při měření kalibrační závislosti byly zjištěné hodnoty RSD 1,2% pro čas oxidace 100 vteřin a 3,7% pro čas oxidace 120 vteřin.

Frekvence dávkování vzorků slouží pro určení doby trvání analýzy, resp. počet vzorků zpracovaných za určitý časový úsek. Při aspiraci 300 μl standardu a optimalizovaných hodnotách ostatních parametrů, analýza jednoho vzorků trvá necelých 6 minut. Frekvence dávkování je tedy 10 vzorků/h.

5.11 Měření reálného vzorku

Pro správné vyhodnocení měření reálného vzorku je výhodné získat matici moči s nulovým obsahem analytu. Pro získání takové matrice byl zvolen postup, kdy se vzorek moči upravil na pH 2 pomocí kyseliny chlorovodíkové (1 ml, 5,8 mol/l HCl na 50 ml vzorku). Filtrací byly odstraněny případné sraženiny a následně byl přidán iontoměnič TMAHP 100 (0,4 g na 50 ml vzorku). Znovu byla provedena filtrace a vzorek mohl být zfiltrován přes hydrofilní membránový filtr PTFE s velikostí pórů 0,45 μm . Část filtrátu byla fortifikovaná standardem na koncentraci 6 $\mu\text{mol/l}$ a oba vzorky byly na závěr zředěny destilovanou vodou v poměru 1:1. Takto upravený vzorek byl dávkován do systému.

Podmínky měření vzorků a fortifikovaných vzorků byly shodné s podmínkami použitými při měření kalibrační křivky. Spolu s absorbcí reálných vzorků byla také změřena absorbance slepého roztoku a standardu. Výsledky měření jsou znázorněny v grafu 12.



Graf 12 Srovnání absorbance slepého vzorku a standardu s reálnými vzorky

Z grafu je patrné, že absorbance upravené moči není shodná s absorbcí slepého roztoku, tj. matrice i po úpravě obsahuje analyt, případně interferující látky. Pro kvantifikaci tohoto efektu byla spočítána hodnota výtěžnosti neboli správnosti. Jedná se o shodu mezi hodnotou získanou měřením a hodnotou správnou. Správnou hodnotu

lze získat měřením ověřenou metodou nebo přípravou vzorku se všemi složkami přípravku a známého množství standardu [42]. Vztah, dle kterého byla výtěžnost spočítána, je uveden v rovnici 7. Výsledná výtěžnost byla 172,09%. Výtěžnost hodnotí účinnost separace analytu ze složitých matric, proto je zřejmé, že při tomto experimentu interferující látky nebyly dostatečně odstraněny. Látkami ovlivňující měření mohou být anionty zachycené na extrakční kolonce nebo látky schopné oxidovat genciánovou violeť.

Rovnice 7 Rovnice výtěžnosti

$$\% = \frac{[Avz. s \text{ přídav.} - Avz.]}{[Ast. - Asl. vz.]} \times 100$$

Avz. s přídav.	Absorbance vzorku s přídavkem známého množství standardu
Avz.	Absorbance vzorku bez přídavku známého množství standardu
Ast.	Absorbance standardu
Asl. vz.	Absorbance slepého roztoku

5.12 Extrakční účinnost SPE kolony

Extrakční účinnost kolony použité k měření absorbance v této diplomové práci byla spočítána podle rovnice 8.

Rovnice 8 Výpočet účinnosti kolony

$$\text{Účinnost kolony} = \frac{\text{Absorbance s kolonkou}}{\text{Absorbance bez kolony}} \times 100 = 103,2\%$$

Pro výpočet byly porovnány hodnoty získané měřením za stejných podmínek, s rozdílem použití nebo nepoužití extrakční kolony. V případě měření bez kolony byl standard připraven v elučním činidle, aby byly podmínky reakce stejné. Absorbance s kolonkou měla hodnotu 0,261 AU (viz 5.3) a bez kolony 0,253 AU (viz 5.4). Tyto hodnoty se téměř neliší, proto lze říci, že byl zvolen správný sorbent, který dostatečně zachytil analyt.

6. SOUHRN

V této diplomové práci byla optimalizována metoda Lab-In-Syringe pro stanovení jódu v průtokovém systému. Pomocí standardu jodidu draselného se optimalizovaly jednotlivé kroky analytické metody. Použitá metoda je založena na oxidační přeměně genciánové violeti z bezbarvé formy na formu barevnou. Jako oxidační činidlo v této reakci vystupuje jód, který vznikl oxidací jodidu, nacházejícího se ve vzorcích, oxidačním činidlem v kyselém prostředí. Při měření reálných vzorků se jako sorbent pro odstranění interferující matrice nejvíce osvědčil iontoměnič TMAHP 100.

Mezi optimalizační kroky patřila optimalizace objemu elučního činidla. Ze zkoušených objemů byla nejvhodnější hodnota 200 μl . Při optimalizaci objemu pufru bylo zjištěno, že je potřeba aspirovat 500 μl tohoto činidla. Odhalilo se, že do systému je důležité čerpat 50% isopropanol, aby se zabránilo adsorpci indikátoru na hydrofobní povrchy pístové pumpy a nedocházelo tím k ovlivňování dalšího měření. Objem kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 0,8 mol/l byl optimalizován na 25 μl . Vyhodnocené množství kyseliny zajistilo dostačující kyselé prostředí pro proběhnutí oxidace jodidu na jód. Během měření došlo ke zjištění, že pořadí aspirace indikátoru a pufru má vliv na hodnoty absorbance, vyššího signálu (a tedy citlivosti) se dosáhne při aspiraci nejprve indikátoru a poté pufru. Při optimalizaci průtokové rychlosti elučního činidla byla nejpříjemnější rychlost 25 $\mu\text{l/s}$. Optimální průtoková rychlost pro retenci analytu na sorbentu byla 15 $\mu\text{l/s}$. Pro oxidaci genciánové violeti byl zvolen čas 120 vteřin z důvodu dosažení lepší lineární závislosti.

Měřením linearity z kalibrační křivky v rozmezí koncentrace standardu 0 – 1,8 $\mu\text{mol/l}$ dosáhl korelační koeficient hodnoty 0,988 při čase oxidace genciánové violeti 100 vteřin a při čase oxidace 120 vteřin hodnoty 0,997. Limit detekce byl při čase oxidace 100 vteřin spočten na 0,033 $\mu\text{mol/l}$ a při čase oxidace 120 vteřin 0,078 $\mu\text{mol/l}$. Limit kvantifikace dosáhl při stejných oxidačních časech hodnot 0,099 $\mu\text{mol/l}$ a 0,234 $\mu\text{mol/l}$. Opakovatelnost při těchto časech byla 1,2% a 3,7%.

7. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo optimalizovat metodu pro stanovení jódu v moči a to tak, aby bylo možné vynechat použití organického rozpouštědla, snížit objem používaných chemikálií na dostačující minimum a zároveň zachovat přijatelnou citlivost metody. Lze říct, že tyto cíle byly splněny. V předcházející diplomové práci Mgr. Patrika Kušníra [37] byla sice frekvence dávkování vzorků stejná (10 vzorků/h) při vyšším aspirovaném objemu standardů (1000 μ l), ovšem do této diplomové práce bylo navíc přidáno několik kroků souvisejících s přidáním kolonkou a extrakcí tuhými fází.

Optimalizovaná metoda je připravena pro stanovení jódu ze vzorků s jednoduchou maticí, u vzorků se složitější maticí je třeba optimalizovat především promývací kroky a vlastní úpravu vzorku před dávkováním do systému.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Zmrazil, V., Čeřovská, J. *Jód a štítná žláza, Optimální příjem jódu a poruchy z jeho nedostatku*. Praha: Mladá fronta a. s., 2014. 52 s. ISBN 978-80-204-3302-2 s. 6-14.
- [2] Markalous, B., Gregorová, M. *Nemoci štítné žlázy 2*. Praha: TRITON, 2004. 136 s. ISBN 80-7254-492-6 s. 31-51.
- [3] Límanová, Z., Němec, J., Zamrazil, V. *Nemoci štítné žlázy*. Praha: Galén, 1995. 197 s. ISBN 80-85824-25-6 s. 26-27.
- [4] Sargis, R. M. *Thyroid gland overview, A major player in regulating your metabolism* [online]. Publikováno 20. 1. 2017 [cit. 2018-3-22]. Dostupné na: <https://www.endocrineweb.com/endocrinology/overview-thyroid>.
- [5] Pikner, R. *E-Klinická biochemie, Štítná žláza – příprava* [online]. [cit. 2018-3-23]. Dostupné na: <https://elius.lfp.cuni.cz/ebio/KlinickaBiochemieCZ.pdf>
- [6] Poršová, I. *Endokrinologie v praxi*. Praha: Grada Publishing, 1995. 168 s. ISBN 80-7169-220-4. s. 30.
- [7] Barrington, E. J. W., The editors of encyclopaedia Britannica *Hormones of the thyroid gland* [online]. Publikováno 22. 11. 2017 [cit. 2018-3-23]. Dostupné na: <https://www.britannica.com/science/hormone/Hormones-of-the-thyroid-gland>.
- [8] Hána, V. *Endokrinologie v praxi*. Praha: Mardorf s. r. o., 2014. 224 s. ISBN 978-80-7345-414-2. s. 80-109.
- [9] Vellanki, P. *Hypothyroidism: Potential symptoms and causes of an underactive thyroid gland* [online]. Publikováno 20. 6. 2014 [cit. 2018-3-23]. Dostupné na: <https://www.endocrineweb.com/conditions/hypothyroidism/hypothyroidism-potential-symptoms-causes-underactive-thyroid-gland>.
- [10] Squatrito, S., Delange, F., Trimarchi, F., Lisi, E., Vigneri, R. Endemic Cretinism in Sicily. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2014, vol. 3, no. 4, s. 295-296.
- [11] Gharib, H., Papini, E., Paschke, R., Duick D., Valcavi, R., Hegedüs, L., Vitti, P. American association of clinical endocrinologists, associazione medici endocrinologi,

and european thyroid association medical guidelines for clinical practice for the diagnosis and management of thyroid nodules: executive summary of recommendations. *AACE Journals*, vol. 16, no. 3, s. 468-475.

[12] **Haap, M., Roth, H., Huber, T., Dittmann, H., Wahl, R.** Urinary iodine: comparison of a simple method for its determination in microplates with measurement by inductively-coupled plasma mass spectrometry. *Scientific reports*, 3. 1. 2017, vol. 7, no. 39835 (2017), s. 1-10.

[13] **Jooste, L. P., Strydom, E.** Methods for determination of iodine in urine and salt. *Best practice & Research clinical endocrinology & Metabolism*, 2010, vol. 24, s. 77-88.

[14] **World Health Organization.** Urinary iodine concentrations for determining iodine status in populations. *World Health Organization*, 2013, WHO/NMH/NHD/EPG/13.1 s. 1-5.

[15] **Springer, D.** Doporučení pro diagnostiku a léčbu onemocnění štítné žlázy v těhotenství a pro ženy s poruchou fertility, kap. Funkční tyreoidální testy v graviditě, *Klinická biochemie a metabolismus*. 2013, no. 1, s. 41-64.

[16] **Trávníček, J., Kroupová, V., Dušová, H., Krhovjáčková, J., Konečný R.** *Optimalizace obsahu jodu v kravském mléce*. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, 2011. 53 s. ISBN 978-80-7394-328-8.

[17] **Sherlor, C., Dasgupta, P.** Review of analytical methods for the quantification of iodine in complex matrices. *Analytica Chimica Acta*. 2011, no. 702, s. 16-36.

[18] **Yaping, Z., Donqxing, Y., Jixiang, C., Tianshiu, L., Huigin, C.** Spectrophotometric determination of urinary iodine by flow-injection analysis with on-line catalytic digestion. *Clinical Chemistry*, 1996, no. 42, s. 2021-2027.

[19] **Wolf, R. E.** *What is ICP-MS? And more importantly, what can it do?* [online].

Publikováno březen 2005 [cit. 2018-3-26]. Dostupné na:

<https://crustal.usgs.gov/laboratories/icpms/intro.html>.

[20] **Kozłowska, K., Polkowska, Ž., Przyjazny, A., Namieśnik, J.** Analytical procedures used in examining human urine samples. *Polish Journal of environmental studies*, 2003, vol. 12, no. 5, s. 503-521.

- [21] **Arena, M., Porter, M., Fritz, J.** Rapid, specific determination of iodine and iodine by combined solid-phase extraction/diffuse reflectance spectroscopy matteo. *Anal. Chem.*, 2002, no. 74, s. 185-190.
- [22] **Kolev, S. D. a Mckelvie I. D.** *Comprehensive analytical chemistry, Advances in flow injection analysis and related techniques*. Elsevier, 2008. 591-594 s. ISBN 978-0-444-53094-3.
- [23] **Harvey D.** *Flow injection analysis* [online]. Publikováno 23. 5. 2016 [cit. 2018-4-7]. Dostupné na:
[https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_\(Harvey\)/13_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Analytical_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_Analytical_Chemistry_2.0_(Harvey)/13_Kinetic_Methods/13.4%3A_Flow_Injection_Analysis).
- [24] **Luque de Castro, M. D.** Flow injection analysis: a new tool to automate extraction processes. *Journal of automatic chemistry of clinical laboratory automation*, 1986, vol. 8, no. 2, s. 56-62.
- [25] **Economou, A.** Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample handling and pre-treatment. *Trends in analytical chemistry*, 2005, vol. 24, no. 5, s. 416-425.
- [26] **Gary, D.** Sequential injection analysis for electrochemical measurement and proces analysis. *Analyst*, 1994, vol. 119, s. 2309-2314.
- [27] **Jiménez, J. R., Luque de Castro, M. D.** Lab-on-valve for the automatic determination the total content and individual profiles of linear alkylbenzene sulfonates in water samples. *Electrophoresis*, 2008, no. 29, s. 590-596.
- [28] **Wu, CH., Scampavia, L., Růžička, J., Zamost, B.** Micro sequential injection: fermentation monitoring of ammonia, glycerol, glucose, and free iron using the novel lab-on-valve system. *Analyst*, 2001, no. 126, s. 291-297.
- [29] **Růžička, J.** Lab-on-valve: universal microflow analyzer on sequential and bead injection. *Analyst*, 2000, no. 125, s. 1053-1060.

- [30] **Yu, Y., Jiang, Y., Chen, M., Wang, J.** Lab-on-valve in the miniaturization of analytical systems and sample processing for metal analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2011, vol. 30, no. 10, s. 1649-1658.
- [31] **Chocholouš, P., Kosarová, L., Šatinský, D., Sklenářová, H., Solich, P.** Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography – Fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column. *Talanta*, 2011, no. 85, s. 1129-1134.
- [32] **Chocholouš, P., Solich P., Šatinský, D.** An overview of sequential injection chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 2007, vol. 600, no. 1-2, s. 129-135.
- [33] **Horstkotte, B., Alexovič, F., Maya, F., Duarte, C., Andruch, V., Cerdà, V.** Automatic determination of copper by in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction of its bathocuproine-complex using long path-length spectrophotometric detection. *Talanta*, 2012, vol. 99, s. 349-356.
- [34] **Frizzarin, R. M., Portugal, L., Estela, J., Rocha, F., Cerdà, V.** On-line lab-in-syringe cloud point extraction for the spectrophotometric determination of antimony. *Talanta*, 2016, vol. 148, s. 694-699.
- [35] **Suárez, R., Horstkotte, B., Cerdà, V.** In-syringe magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for automation and downscaling of methylene blue active substances assay. *Talanta*, 2014, vol. 130, s. 555-560.
- [36] **Agrawal, O., Sunita, G., Gupta, VK.** A sensitive colorimetric for the micro determination of iodine in marine water. *Talanta*, vol. 49, no. 4, s. 923-928.
- [37] **Kušnír, P.** Vývoj a optimalizace metody pro stanovení jódu v různých matricích. Hradec Králové: Univerzita Karlova. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Katedra analytické chemie, 2017. 52 s., 3 s. příloh. Vedoucí diplomové práce PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.
- [38] **Patočka, J.** *Nebezpečí chloroformu* [online]. Publikováno 25. 11. 2017 [cit. 2018-2-15]. Dostupné na:
<http://toxicology.cz/modules.php?name=News&file=article&sid=142>.

- [39] **IONTOSORB:** *Iontosorb TMAHP* [online]. Ústí nad Labem. [cit. 2018-2-11]. Dostupné na: <https://www.iontosorb.cz/pages/iec/iontos03.htm>.
- [40] **Sitanurak, J., Inpota, P., Mantim, T., Ratanawimamwong, N., Wilairat, P., Nacapricha, D.** Simultaneous determination of iodide and creatine in human urine by flow analysis with an on-line sample treatment column. *Analyst*, 2015, no. 140, s. 295-302.
- [41] **Beránek, M., Tichý, M.** *Vybrané kapitoly z klinické biochemie*. Karolinum Univerzita Karlova v Praze, 2013. 197 s. ISBN 978-80-246-2186-9.
- [42] **Klimeš, J.** *Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami*. Nucleus HK, 2011. 265 s. ISBN 978-80-87009-29-1.

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1 Srovnání absorpance reálných vzorků a fortifikovaných reálných vzorků se standardem.....	31
Graf 2 Závislost absorpance na objemu elučňního činidla	32
Graf 3 Závislost absorpance na použitém objemu pufru	33
Graf 4 Závislost absorpance na koncentraci jodidu draselného a na použití isopropanolu	35
Graf 5 Závislost absorpance na použitém objemu kyseliny chlorovodíkové	36
Graf 6 Srovnání hodnot absorpance při měření s různým pořadím aspirace genciánové violeti a citrátového pufru.	37
Graf 7 Závislost absorpance na průtokové rychlosti aspirace chloridu sodného.....	38
Graf 8 Závislost absorpance na průtokové rychlosti aspirace standardu.....	39
Graf 9 Závislost absorpance na čase oxidace genciánové violeti	41
Graf 10 Závislost absorpance na koncentraci jodidu draselného při různých časech oxidace genciánové violeti.....	41
Graf 11 Kalibrační křivka	43
Graf 12 Srovnání absorpance slepého vzorku a standardu s reálnými vzorky.....	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Denní potřeba jodu	11
Tabulka 2 Podmínky při měření kalibrační křivky	42
Tabulka 3 Hodnoty naměřené absorpance při oxidačním čase genciánové violeti 100 vteřin a aspirovaném objemu standardu 500 μ l.	43

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Schéma systému FIA.....	18
Obrázek 2 Schéma systému SIA.....	18
Obrázek 3 Schéma systému Lab-On-Valve.....	19
Obrázek 4 Schéma systému SIC.....	20
Obrázek 5 Schéma použitého měrného systému.....	25
Obrázek 6 Oxidace genciánové violeti.....	26
Obrázek 7 Struktura Iontosorbu TMAHP 100.....	30

SEZNAM ROVNIC

Rovnice 1 Sandell-Kolthoffova reakce.....	14
Rovnice 2 Oxidace jodidu na jód.....	26
Rovnice 3 Lambert-Beerův zákon.....	27
Rovnice 4 Obecná rovnice lineární regrese.....	44
Rovnice 5 Výpočet limitu detekce.....	45
Rovnice 6 Výpočet limitu kvantifikace.....	45
Rovnice 7 Rovnice výtěžnosti.....	47
Rovnice 8 Výpočet účinnosti kolonky.....	48

9. PŘÍLOHA Č. 1: PROGRAM NA MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKY

'Vypuštění do odpadu

ExternalPump Command (?) J0R
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 300
ExternalPump Valve Out
ExternalPump Empty
ExternalPump Delay Until Done

Position = 3

ExternalPump Command (?) O1R

'Aspirace vody

Multiposition Valve port 1
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 20
ExternalPump Aspirate (microliter) 200
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace standardu

Multiposition Valve port Position
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 15
ExternalPump Aspirate (microliter) 300
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 5

'Aspirace vody

Multiposition Valve port 1
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 10
ExternalPump Aspirate (microliter) 200
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 5

'Aspirace isopropanolu pro slabé mytí

Multiposition Valve port 4
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 10
ExternalPump Aspirate (microliter) 500
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 5

'Aspirace vzduchu

Multiposition Valve port 6
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 100
ExternalPump Aspirate (microliter) 300
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Vypuštění do odpadu

ExternalPump Command (?) O9R
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 250
ExternalPump Empty
ExternalPump Delay Until Done

Insert File

C:\Users\Obsluha\Desktop\LipenskáZ\ProcedureCleaningSyringeFromPort6.fia

Insert

FileC:\Users\Obsluha\Desktop\LipenskáZ\ProcedureCleaningDetectorFromPort6.fia

Insert File

C:\Users\Obsluha\Desktop\LipenskáZ\ProcedureCleaningDetectorFromPort8.fia

ExternalPump Aspirate (microliter) 300

ExternalPump Delay Until Done

'Aspirace elučního činidla

ExternalPump Command (?) O1R
Multiposition Valve port 5
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 25
ExternalPump Aspirate (microliter) 500
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace vzduchu

Multiposition Valve port 6
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 100
ExternalPump Aspirate (microliter) 300
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 3

'Aspirace kyseliny

ExternalPump Command (?) J7R
ExternalPump Command (?) O2R
ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 150
ExternalPump Aspirate (microliter) 50
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace oxidačního činidla

ExternalPump Command (?) O3R
ExternalPump Aspirate (microliter) 300
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace vzduchu

ExternalPump Command (?) O8R
ExternalPump Aspirate (microliter) 300

ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace isopropanolu

ExternalPump Command (?) O6R
ExternalPump Aspirate (microliter) 200
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace indikátoru

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 50
ExternalPump Command (?) O4R
ExternalPump Aspirate (microliter) 100
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Aspirace pufru

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 100
ExternalPump Command (?) O5R
ExternalPump Aspirate (microliter) 500
ExternalPump Delay Until Done
Delay (sec) 1

'Oxidace LCV

ExternalPump Command (?) O7R
Delay (sec) 120
ExternalPump Command (?) J0R

'Měření

ExternalPump Flowrate (microliter/sec) 200
Spectrometer Analyte New Sample
Spectrometer Absorbance Scanning
ExternalPump Empty
ExternalPump Delay Until Done
Spectrometer Stop Scanning