

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA FARMACEUTICKÉ CHEMIE A KONTROLY LÉČIV



Analytické hodnocení léčiv s využitím spektrálních metod II.

Tereza Vondráčková

Diplomová práce

HRADEC KRÁLOVÉ

2013

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Magisterský studijní program

Analytické hodnocení léčiv s využitím spektrálních metod II.

Analytical determination of drugs by spectral methods II.

Tereza Vondráčková

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Pavla Pilařová, Ph.D.

Hradec Králové, 12. května 2013

Prohlášení autora

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

Hradec Králové, 12. května 2013

Tereza Vondráčková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat své školitelce Mgr. Pavle Pilařové, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při realizaci této práce. Dále děkuji všem pracovníkům katedry farmaceutické chemie a kontroly léčiv za pomoc a vstřícné jednání.

Obsah

Souhrn.....	8
Abstract.....	9
1. Úvod	10
2. Cíl	11
3. Teoretická část.....	12
3.1. Olovo a jeho vlastnosti	13
3.1.1. Účinky olova na organismus	13
3.1.2. Otrava olovem.....	14
3.1.3. Léčba otravy olovem.....	14
3.2. Nikl a jeho vlastnosti.....	15
3.2.1. Účinky niklu na organismus	15
3.2.2. Otrava niklem	16
3.2.3. Léčba otravy niklem.....	16
3.3. Spektrální metody	17
3.4. Atomová absorpční spektrometrie (AAS)	19
3.4.1. Historie AAS	19
3.4.2. Atomová spektra	19
3.4.3. Princip metody.....	21
3.4.4. Instrumentace.....	22
3.4.5. Interference v AAS	25
3.4.6. Analytické využití.....	25
3.5. Validace analytických metod.....	27
3.5.1. Správnost	27
3.5.2. Přesnost.....	27
3.5.3. Linearita.....	28

3.5.4.	Selektivita, specificita	28
3.5.5.	Detekční limit (LOD)	28
3.5.6.	Kvantitativní limit (LOQ).....	28
3.5.7.	Robustnost	29
3.6.	Validace metody AAS.....	30
3.6.1.	Přesnost - výtěžnost.....	30
3.6.2.	Opakovatelnost	30
3.6.3.	Linearita.....	30
3.6.4.	Mez stanovitelnosti	30
3.7.	Shimadzu AA-7000 Series	31
4.	Experimentální část	34
4.1.	Materiály a pomůcky.....	35
4.1.1.	Chemikálie.....	35
4.1.2.	Další použité chemikálie	35
4.1.3.	Přístroj	35
4.1.4.	Podmínky měření	35
4.1.5.	Další použité přístroje	35
4.1.6.	Pomůcky	36
4.2.	Příprava roztoků.....	37
4.2.1.	Linearita - olovo.....	37
4.2.2.	Linearita – nikl.....	39
4.2.3.	Příprava roztoků zkoušené látky – glukózy.....	39
4.2.4.	Přesnost - opakovatelnost – olovo, nikl.....	39
4.2.5.	Správnost – olovo, nikl.....	39
5.	Výsledky a diskuze.....	40
5.1.	Správnost – olovo.....	41
5.2.	Opakovatelnost – olovo	42

5.3.	Správnost – nikl	43
5.4.	Opakovatelnost – nikl.....	44
5.5.	Linearita – olovo	45
5.6.	Linearita – nikl.....	46
6.	Závěr	47
7.	Použitá literatura.....	48

Seznam zkratkou použitých v textu

AAS	-	Atomic Absorption Spectroscopy Atomová absorpční spektrometrie
ČL	-	Český lékopis
DDC	-	Diethyldithiocarbamate Diethyldithiokarbamát sodný
DMSA	-	Dimercaptosuccinic acid Kyselina dimerkaptojantarová
ETA	-	Electro-Thermal Atomizer Elektrotermický atomizér
IQ	-	Intelligence quotient Intelligenční kvocient
LOD	-	Limit of Detection Detekční limit
LOQ	-	Limit of Quantitation Kvantitativní limit

Souhrn

Analytické hodnocení léčiv s využitím spektrálních metod II.

Diplomová práce

Tereza Vondráčková

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Byla optimalizována metoda společného stanovení olova a niklu v glukóze pomocí atomové absorpční spektrometrie. Práce byla prováděna na přístroji Shimadzu AA-7000 Series s atomizací v plameni. Byla použita kombinace plynu acetylen-vzduch a vzorky byly měřeny při vlnové délce 283,3 nm pro olovo a 232,0 nm pro nikl.

Metoda byla za daných podmínek validována, byla ověřena přesnost, správnost a linearita stanovení. Všechny testované parametry splnily předepsaná kritéria.

Klíčová slova: Atomová absorpční spektrometrie, olovo, nikl.

Abstract

Analytical determination of drugs by spectral methods II.

Thesis

Tereza Vondráčková

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

A method for determining plumb and nickel in glucose by atomic absorption spectrometry has been optimized. We used Shimadzu AA-7000 Series with atomization in the flame. A combination of acetylene and air was used and specimens were measured at wave length 283.3 nm for plumb and at 232.0 for nickel.

Following these conditions the method was validated. The accuracy, precision and linearity were also verified. All tested parameters satisfied the criterions.

Key words: Atomic Absorption Spectroscopy, Plumb, Nickel.

1. Úvod

Olovo je vysoce toxický kov, který má četné účinky na organismus. Při otravě vznikají závažné zdravotní problémy, které mohou končit až smrtí. Otravu můžeme rozdělit na akutní a chronickou.^[1] V dnešní době se při léčbě otrav používá kyselina dimerkaptojantarová.^[2]

Nikl je stříbrobílý kov, který se používá už od starověku. Je to alergizující kov, který při styku s kůží způsobuje vznik kontaktních alergií. Prevalence těchto alergií je vysoká.^[3]

Atomová absorpční spektrometrie je analytická metoda, jejímž principem je absorpce záření volnými atomy vznikajícími v atomizátorech. Metoda byla popsána již v roce 1802.^[4] Atomové absorpční spektrum je spektrum čárové, které se jeví jako tmavé čáry na světlém pozadí. Přístroje pro AAS se skládají z čárového zdroje, atomizátoru, monochromátoru a detektoru.^[5] Metoda vykazuje vysokou citlivost a selektivitu, čehož se využívá např. u stanovení nízkých obsahů toxických prvků.^[6]

2. Cíl

Cílem práce byla analýza olova a niklu jako nečistot pomocí atomové absorpční spektrometrie. Analýza byla prováděna sloučením jednotlivých lékopisných metod předepsaných pro tyto nečistoty. Společná metoda byla optimalizována a validována. Zpracováním experimentálních dat byla ověřena vhodnost metody k danému použití a výsledky analýz jsou správné, přesné a reprodukovatelné.

3. Teoretická část

3.1. Olovo a jeho vlastnosti

Olovo patří mezi nejznámější toxické těžké kovy. Ve starém Římě bylo používáno při stavbách kanalizací a vodovodů, u nás se pro podobné účely používalo ještě v první polovině 20. století.

Olovo je šedý, měkký, dobře tvarovatelný kov, který se na vzduchu pokrývá tenkou vrstvou oxidu olovnatého. Touto vrstvou je chráněn před další oxidací. Olovo se nejčastěji vyrábí z galenitu PbS – nejdůležitější ruda olova. Oxid olovičitý je sloučenina, která se používá při výrobě olovených akumulátorů. Páry olova a jeho sloučeniny jsou jedovaté.^[7]

Hlavními zdroji olova, které vznikají činností člověka, jsou spalovací procesy (dříve spalování benzínu s přídavkem olova), dále slévárny, ocelárny, spalovny odpadů, spalování uhlí. Do vody se může dostat pomocí odpadních vod ze zpracování rudy, z výroby akumulátorů, ze sklářského průmyslu.^[8] Obalové materiály jsou zdrojem olova, díky nimž se olovo dostává do potravního řetězce.^[9]

3.1.1. Účinky olova na organismus

Olovo je vysoce toxický kov, který se nachází v malém množství v zemském obalu. S ohledem na jeho dostupnost, nízkou cenu a fyzikální vlastnosti, jsou olovo a jeho sloučeniny široce používány v barvách, keramice, potrubí, palivu, bateriích a kosmetice.^[10] Od roku 2001 koncentrace olova v krvi české dospělé i dětské populace významně klesá. Důvodem může být mimo jiné zákaz používání benzínu s přídavkem olova. I přesto, že se koncentrace olova snižuje, je dále nezbytné snižovat obsah olova v prostředí, je to jeden z nezbytných preventivních kroků. Ověřením preventivních opatření je monitorování hladiny olova v krvi.

Mezi účinky olova při vyšších expozicích patří např. vliv na krvetvorbu (anémie), nervový systém, inhibice syntézy některých enzymů, pokles glomerulární filtrace, ovlivnění imunitního systému, zvýšení krevního tlaku, gastrointestinální potíže, poruchy sluchu, poruchy reprodukce aj.^[8] Porucha mentálního vývoje a vývoje chování u dětí – např. hyperaktivita, deficit jemné motoriky, zpomalené reakce, snížená výkonnost a nižší IQ, je spojeno s daleko nižšími dávkami olova. U dětí dochází ke snížení IQ a poruchám chování u hladin pod 10 µg/dl v krvi.^[11]

3.1.2. Otrava olovem

Olovo se do těla dostává inhalací prachových částic, které obsahují olovo, a dále trávicím traktem. V případě dýchacího ústrojí se v těle resorbuje okolo 40 – 50 %, trávicím traktem cca 10 % (u dětí to může být více). Olovo se v těle ukládá v místech, kde se nachází vápník. V kostech se ukládá přes 90 % celkového olova, které se pak může uvolňovat celé roky. Při otravě olovem se vyskytují závažné nežádoucí účinky.

K akutní otravě olovem může dojít při požití vysokých dávek olovnatých solí.^[1] Mezi příznaky akutní otravy olovem patří velmi intenzivní křečovitá bolest břicha, encefalopatie, anémie, neuropatie a Fanconiho syndrom (onemocnění proximálních tubul ledvin).^[12]

Příznaky chronické otravy olovem se projevují únavou, ztrátou chuti k jídlu, bolestí hlavy, zácpou a bledostí. Dochází ke zvýšení krevního tlaku, tepová frekvence je zpomalena. Objevuje se podrážděnost, zmatenost (případně halucinace), křeče. To pak vyústí v kóma a následně po 1 - 2 dnech dojde k úmrtí.^[1]

3.1.3. Léčba otravy olovem

V současné době se k léčbě otravy olovem používají chelátotvorné léky. Dochází k vytvoření chelátu, který se vylučuje močí. Využívá se kyselina dimerkaptojantarová – DMSA (sukcimer).^[2]

3.2. Nikl a jeho vlastnosti

Nikl je sedmým nejvíce rozšířeným prvkem na Zemi.^[13] Už od starověku se používal na výrobu. Je to stříbrobílý kov, který se nachází v VIII. B skupině periodické tabulky prvků. Má relativně vysokou tepelnou i elektrickou vodivost a feromagnetické vlastnosti, jež jsou nižší než u stříbra a železa. Je odolný vůči korozi a alkáliím.^[3] S kyselinami reaguje ochotně, ale za vhodných podmínek dochází k pasivaci jeho povrchu. Jelikož je odolný vůči hydroxidům alkalických kovů, vyrábějí se z něho technologická zařízení určená pro výrobu hydroxidu sodného.^[13]

Hlavní produkce niklu je využívána pro výrobu nerezové oceli, slitiny niklu a dále na výrobu mincí, nářadí, strojů, domácích spotřebičů aj.^[3] Používání niklu v klenotnictví vede ke vzniku kontaktních dermatitid u osob citlivých na nikl.^[14]

Co se týče antropogenního zdroje niklu (např. kontaminace vod), jsou to především odpadní vody z povrchové úpravy kovů nebo z barevné metalurgie. Do pitné vody se dostává nikl hlavně v důsledku louhování z materiálů, které jsou v kontaktu s vodou – vodovodní trubky aj.^[15]

3.2.1. Účinky niklu na organismus

Dlouhodobá inhalace niklu má za následek vznik astma bronchiale, chronické rhinitidy a sinusitidy, vznik nosních polypů a perforace nosní přepážky. Na zvířecím modelu působil nikl jako silný vasokonstriktor, ale pro tento účinek při působení niklu v pracovním prostředí není dostatek důkazů. Při styku s kůží patří nikl mezi nejčastěji alergizující kovy. Prevalence těchto alergií je vysoká. Dochází ke vzniku kontaktních dermatitid, u žen se vyskytují více než u mužů, pravděpodobně s ohledem na nošení šperků a hodinek.^[3]

3.2.2. Otrava niklem

Většina akutních otrav niklem je spojena s vystavením se karbonylu niklu. Počáteční účinky intoxikace niklem se projevují podrážděním respiračního traktu a dále se objevují nespecifické příznaky – závratě, bolest hlavy, nauzea, zvracení, dušnost, tíha na hrudi a neproduktivní kašel. Pacientům s těžkou otravou se vyvine silná plicní a gastrointestinální toxicita. Rozvinutá intersticiální pneumonitida, mozkový edém a krvácení je hlavní příčinou smrti.^[3]

U náhodné akutní expozice kontaminovanou vodu se u postižených jedinců vyskytovaly příznaky jako nauzea, bolest hlavy, zvracení, průjem, potíže s dechem, ale tyto příznaky ve většině případů odezněly po několika hodinách, u pár jedinců přetrvávaly 1 – 2 dny.^[15]

3.2.3. Léčba otravy niklem

První pomoc při akutní otravě niklem by mělo být okamžité odstranění zdroje otravy. Jelikož je tu potenciální riziko i dermální absorpce, mělo by být odstraněno i kontaminované oblečení. V počáteční fázi otravy je první pomoc hlavně zaměřená na suplementaci kyslíku, většinou je potřeba asistovaná ventilace. Pacienti se symptomy otravy karbonylu niklu a ti, kteří byli vystaveni vysokým dávkám, by měli být transportováni na pohotovost k podrobnějšímu vyšetření.

Mezi antidota patří diethyldithiokarbamát sodný (DDC), disulfiram, který se během metabolismu rozkládá na dvě molekuly DDC.^{[16] [17]}

U závažných kontaktních dermatitid se k léčbě používají protizánětlivé topické léky. Pokud je účinek nedostatečný, používá se systémová aplikace výše zmiňovaných chelátů - diethyldithiokarbamát sodný (DDC) a disulfiram. Účinek je však pouze částečný.^[18]

3.3. Spektrální metody

Spektrometrie je obor, který se zabývá měřením a vyhodnocováním elektromagnetického záření, které je emitováno hmotou nebo s touto hmotou interaguje. Jejím cílem je důkaz stanovované látky pomocí interakce elektromagnetického záření se zkoumanou látkou. Využívá se pro studium struktury nebo koncentrace dané látky. Spektrální metody se dělí do dvou hlavních skupin:

1. *interakce, při kterých dochází k výměně energie mezi zářením a zkoumanou látkou*
2. *interakce, při kterých zkoumaná látka pouze ovlivňuje některé vlastnosti procházejícího záření bez výměny energie*

U první skupiny vznikají interakce tím, že dochází ke změně energetického stavu dané látky přijmutím nebo vyzářením energie. Tyto metody se rozdělují podle několika základních hledisek. Pokud dochází k absorpci nebo emisi záření, nebo k některému jevu, který souvisí s absorpcí nebo emisí (absorpční, emisní, fluorescenční). Další možností klasifikace je, když dochází při absorpci nebo emisi záření ke změnám energie pouze atomů nebo celých molekul (atomová, molekulová). V neposlední řadě podle oblasti vlnových délek absorbovaného záření (rentgenová, ultrafialová, viditelná a infračervená spektrometrie).^[19]

Příklady jednotlivých metod:

- **Rentgenová spektrometrie** – využívá se ke kvalitativní analýze (vyhodnocení přítomnosti jednotlivých prvků z polohy charakteristických čar) a dále ke kvantitativní analýze (vyhodnocení koncentrace prvků).^[19]
- **Atomová emisní spektrometrie** – principem je sledování emise elektromagnetického záření volnými atomy látek, které se nacházejí v plynném stavu.^[5]
- **Atomová absorpční spektrometrie** (viz kapitola 3.4.)

- **Molekulová absorpční spektrometrie v ultrafialové a viditelné oblasti** – zabývající se měřením a výkladem elektronových spekter molekul látek (absorpce elektromagnetického záření v rozmezí vlnových délek 200 – 800 nm).^[19]
- **Molekulová absorpční spektrometrie v infračervené oblasti** - zabývající se měřením a výkladem elektronových spekter molekul látek (absorpce elektromagnetického záření v rozmezí vlnových délek 800 nm – 100 μm).^[19]
- **Ramanova spektrometrie** – měření rozptýleného záření vznikající interakcí monochromatického záření s molekulami vzorku, při této interakci se také mění i jejich vibrační a rotační stavy.^[5]

U druhé skupiny je u průchozího záření vzorkem ovlivňována rychlost a směr průniku (refraktometrie, interferometrie – měření indexu lomu), stáčení roviny polarizovaného záření (polarimetrie). Dále může být záření difraktováno (rentgenová difraktometrie) nebo rozptylováno, a to částicemi kalného roztoku (turbidimetrie a nefelometrie).^[19]

Příklady jednotlivých metod:

- **Refraktometrie, interferometrie** – obě tyto metody spočívají v měření indexu lomu látek (u refraktometrie se měří přímo index lomu látky, u interferometrie rozdíl indexu lomu mezi srovnávací a měřenou látkou), toho se využívá k identifikaci látek a zjištění jejich čistoty.^[19]
- **Polarimetrie** – principem polarimetrie je schopnost stáčení roviny polarizovaného světla u opticky aktivních látek.^[5]
- **Turbidimetrie a nefelometrie** – principem je sledování rozptylu světla částicemi, které jsou suspendovány v kapalině (v turbidimetrii se měří intenzita nerozptýleného záření, v nefelometrii intenzita záření rozptýleného částicemi).^[19]

3.4. Atomová absorpční spektrometrie (AAS)

Atomová absorpční spektrometrie (AAS) patří mezi analytické metody. Jejím principem je absorpce záření volnými atomy v plynném stavu vznikajícími v atomizátorech. Volné atomy, které se nacházejí v plynném stavu, absorbují fotony určité energie, záření o určité vlnové délce. Energetická hodnota fotonů charakterizuje určitý druh atomů, množství absorbovaných fotonů je mírou množství stanovených atomů. Touto metodou se stanovuje více než 60 prvků, kovů a polokovů.^[4] Metoda má vysokou citlivost a selektivitu, čehož se využívá u stanovení nízkých obsahů toxických prvků v životním prostředí.^[6]

3.4.1. Historie AAS

Atomová absorpční spektrometrie byla poprvé popsána již v roce 1802, kdy Wollaston pozoroval sluneční spektrum, kde objevil tmavé čáry, které v roce 1815 podrobně studoval Fraunhofer. Dalším zkoumáním vědců Kirchhoffa a Bunsena bylo zjištěno, že Fraunhoferova tmavá čára D je totožná s čarou alkalického kovu sodíku. Na základě tohoto poznání byl popsán Kirchhoffův zákon, který vyjadřuje vztah mezi emisí a absorpcí. Z počátku byly tyto poznatky používány pouze astronomy pro stanovení koncentrace kovů v atmosféře hvězd. Až v roce 1939 Woodson využil rtuťové výbojky jako zdroje záření k analýze rtuti v ovzduší. V roce 1954 sestavil Walsh první atomový absorpční spektrometr a za to je mu přisouzen objev AAS jako analytické metody.^[4]

3.4.2. Atomová spektra

Atomy mohou pohlcovat (absorbovat) nebo naopak vysílat (emitovat) elektromagnetické záření určité energie. Elektronové stavy se vyskytují v určitých energetických hladinách, ty určují energii atomů v různých stavech. K přechodu elektronů mezi energetickými hladinami dochází při absorpci nebo emisi záření. Podle toho, na kterou hladinu byl elektron excitován, se liší energie jednotlivých stavů atomů. Atom může při přechodu mezi jednotlivými stavy pohlcovat nebo emitovat foton, jehož energie je rovna přírůstku nebo úbytku energie atomů ΔE dle Planckova vztahu:

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h \cdot \nu$$

E_2, E_1energie atomu ve vyšším a nižším energetickém stavu

hPlanckova konstanta ($6.626 \cdot 10^{-34}$ J. s)

νfrekvence vyzářeného nebo absorbovaného záření

Záření můžeme charakterizovat také pomocí vlnové délky nebo vlnočtu:

$$\nu = c / \lambda = c \cdot \tilde{\nu}$$

crychlost záření

λvlnová délka

$\tilde{\nu}$vlnočty

K excitaci dochází při absorpci elektromagnetického záření nebo předáním energie, vlivem elektrického výboje, zahřátím na vysokou teplotu apod.^[4] Atomová absorpční spektra se nacházejí v rozmezí vlnových délek 190 – 900 nm. Spojený zákon Bougherův - Lambertův a Beerův vyjadřuje skutečnost, že prochází-li monochromatické záření vhodným absorpčním prostředím o tloušťce b a počtu volných atomů v základním stavu N_0 , má to za následek zeslabení toku záření z původní hodnoty ϕ_0 [$J \cdot s^{-1}$] na hodnotu ϕ :

$$A = \log \frac{\phi_0}{\phi} = \kappa_\lambda \cdot b \cdot N_0$$

btloušťka absorpčního prostředí

N_0počet volných atomů v základním stavu

Aabsorbance

ϕ_0původní hodnota toku záření

ϕzeslabená hodnota toku záření

κ_λkonstanta úměrnosti – atomový absorpční koeficient

Absorbance je logaritmus poměru původního a prošlého zářivého toku. Je úměrná tloušťce absorbující vrstvy a počtu atomů v základním stavu. Atomový absorpční koeficient je

konstanta úměrnosti, která je charakteristická pro absorbující prvek při dané vlnové délce a má rozměr plochy [m²].^[6]

U atomového absorpčního spektra se jedná o spektrum čárové, jeví se jako tmavé čáry na světlém pozadí.

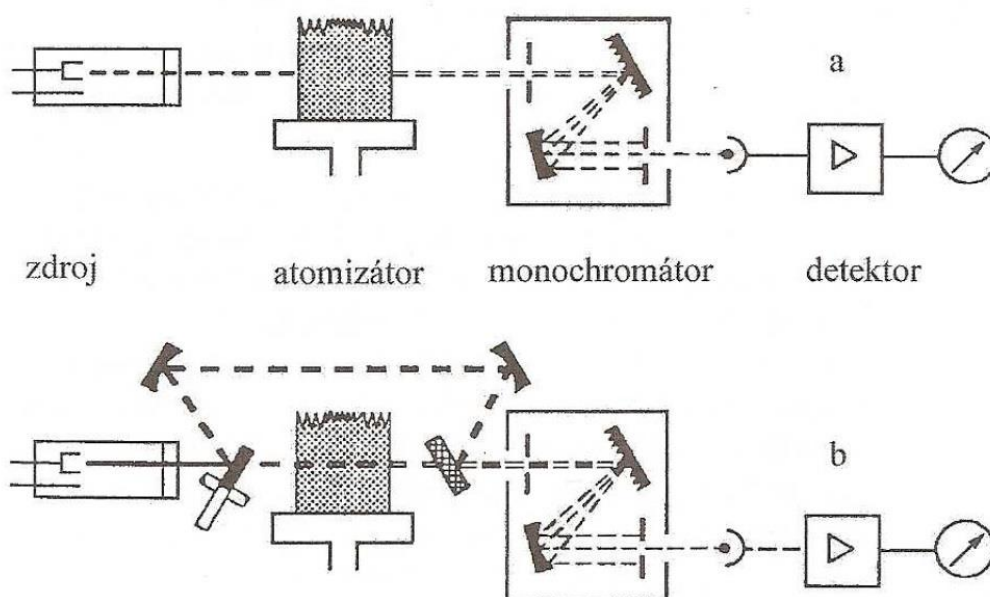
Atomová emisní spektra jsou naopak zářící čáry na černém pozadí a jedná se také o čárové spektrum.^[5]

3.4.3. Princip metody

Principem metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy v plynném stavu. Nutné je použít jako zdroj záření stejný prvek, který chceme stanovit. Ten nám poskytne právě emisní záření požadované vlnové délky. Pohlcovat se bude pouze část záření, která odpovídá svými vlnovými délkami rezonančním čarám. Absorpční spektrum je jednodušší než emisní, rezonančních čar je mnohem méně než u emisního spektra. Pro měření se vybere ta čára, která má největší absorpci záření.^[5]

3.4.4. Instrumentace

Přístroje pro AAS můžou být sestaveny jako jednopaprskové a dvoupaprskové. (viz obrázek 1)



Obrázek 1 Schéma jedno- (a) a dvou- (b) paprskového atomového absorpčního spektrometru. Převzato z KOMÁREK, Josef. *Atomová absorpční spektrometrie.*, 2000. ^[4]

Jednopaprskový systém má větší optickou propustnost, nižší šum signálu a lepší mez detekce. Stabilita systému je ale nižší a nelze eliminovat kolísání intenzity zdrojů záření. Záření ze zdroje, které je mechanicky nebo elektricky modulované, prochází absorpčním prostředím, monochromátorem a dopadá na detektor.

Dvoupaprskový systém má vysokou stabilitu, ale dochází k větší ztrátě záření a zvýšení úrovně šumu. Ze zdroje vychází paprsek, který se střídavě propouští přes atomizátor (měrný paprsek) a mimo atomizátor (referenční paprsek), to se děje pomocí optických prvků, zrcadlových přerušovačů a děličů. Pomocí polopropustného zrcadla nebo rotujícího zrcadlového sektoru se oba paprsky sjednotí. Tyto časově rozlišené signály jsou pak pozorovány.^[4]

Přístroj se skládá z čárového zdroje, atomizátoru, monochromátoru a detektoru.

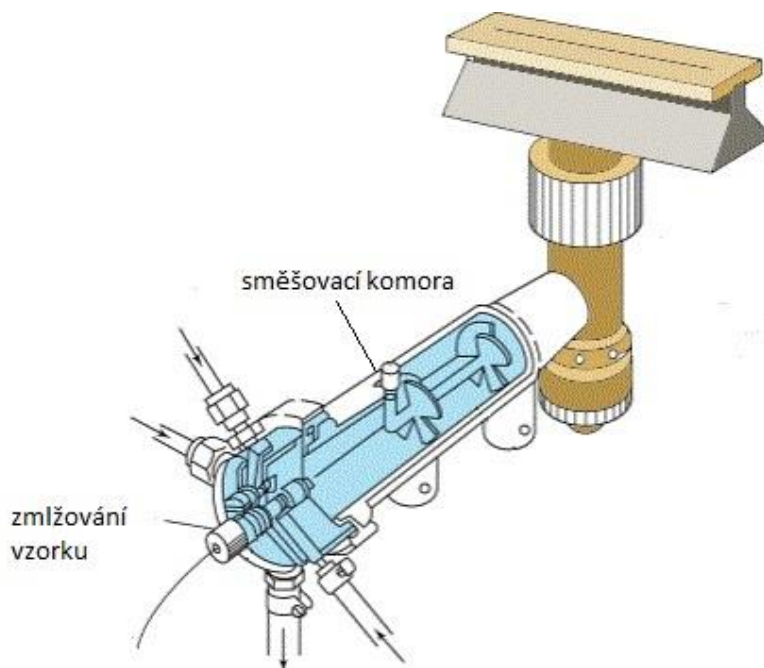
Čárový zdroj

Čárový zdroj je výbojka s dutou katodou. Katoda je dutý váleček. Je ze stejného kovu, který se stanovuje. Wolframový nebo molybdenový drát slouží jako anoda. Výbojka může obsahovat i více prvkovou katodu (až ze tří různých prvků). Lampa obsahuje argon (neon) o tlaku do 1 kPa. Vložení napětí 400 V má za následek vznik doutnavého výboje, při němž vznikají ionizované atomy vzácného plynu. Tyto atomy bombardují kov, dochází k uvolnění atomů kovů, které do sebe narážejí, tím excitují a při deexcitaci vysílají potřebné záření.^[5]

Atomizátor

Funkcí atomizátoru je převedení vzorku do stavu volných atomů. Teplota potřebná k dostatečné atomizaci je zpravidla 2000 až 3000 °C. Používají se dva typy atomizátorů – plamenový (viz obrázek 2) nebo elektrometrický.

- ✓ *Plamenový atomizátor* funguje na principu zmlžování nebo ultrazvukového rozprašování roztoku daného vzorku. Aerosol vzorku se smísí s topným plynem a oxidovadlem. Tato směs je vnesena do plamene, kde dochází k atomizaci. Univerzální hořáky, které se často používají, mají délku 50 mm. Nejčastěji používané plameny jsou acetylen/vzduch, acetylen/N₂O.



Obrázek 2 Plamenový atomizátor – upraveno dle GARCES, Fred. Atomic Absorption Spectroscopy: Instrumental.^[20]

✓ *Elektrotermický atomizátor (ETA)* je grafitová trubice, která je vyhřívána elektrickým proudem, kterou prochází záření. Pomocí mikropipety o objemu 5 až 50 μl se na vnitřní stěnu trubice nanáší daný vzorek, nebo se vzorek umístí na nosnou podložku. Pracuje se v ochranné atmosféře s proudem argonu. Teplotní program se skládá ze tří fází:

- **sušení** (50 – 200 °C) – odpaření rozpouštědla
- **žihání** (200 – 800 °C) – rozklad matrice
- **atomizace** (2000 – 3000 °C) – během několika sekund dojde k prudkému zahřátí na teplotu atomizace, může být i nižší než dané rozmezí.^[5]

Monochromátor

Mřížkový monochromátor slouží k izolaci záření vhodné vlnové délky a je uložen za plamenem. Natočením mřížky se nastaví vlnová délka rezonanční čáry na maximum propustnosti. Důležité je nastavení šířky spektrálního intervalu tak, aby na detektor nedopadalo i tzv. neabsorbující balastní záření čar blízkých vlnových délek, které způsobuje zakřivení koncentrační závislosti absorbance. Šířka vstupní a výstupní štěrbiny je regulovatelná a je většinou od 0,1 nm do 2,0 nm.^[6]

Detektor

Pro detekci se využívá fotonásobič, který je spolu s fotokatodou uložen těsně za výstupní štěrbinou monochromátoru a slouží k detekci toků záření.^[6] K výhodám fotonásobiče patří jeho vysoká citlivost a velmi nízká časová konstanta. Výsledný signál může být zachycen buď analogovým zařízením, nebo je převeden na digitální formu, která dále umožňuje matematické zpracování.^[19]

3.4.5. Interference v AAS

Interference v AAS způsobuje systematické odchylky velikosti signálu při analýze. Jsou to tzv. rušivé vlivy, které mohou zásadně ovlivnit výsledek a správnost měření. Interference můžeme rozdělit na spektrální a nespektrální.

Spektrální interference jsou způsobeny nedokonalou izolací měřené spektrální čáry od záření, které je absorbováno ostatními složkami vzorku nebo absorpcí pozadí. Těmto nežádoucím jevům se lze vyhnout volbou jiných čar pro analýzu a korekcí pozadí.^[19]

Mezi nespektrální interference patří např. rušivý vliv transportu vzorku do plamene (změna rychlosti sání a účinnosti zmlžování, které může být ovlivněno povrchovým napětím, hustotou nebo viskozitou vzorku), dále vypařování kondenzované fáze, kde vznikají sloučeniny s odlišnou těkavostí, a také interference v plynné fázi způsobené např. změnou prostorového rozložení volných atomů v plameni.^[6]

3.4.6. Analytické využití

Atomová absorpční spektrometrie se používá pro elementární kvantitativní analýzu kovových prvků, které mají nízkou koncentraci a to metodou kalibrační křivky nebo metodou standardního přídatku.

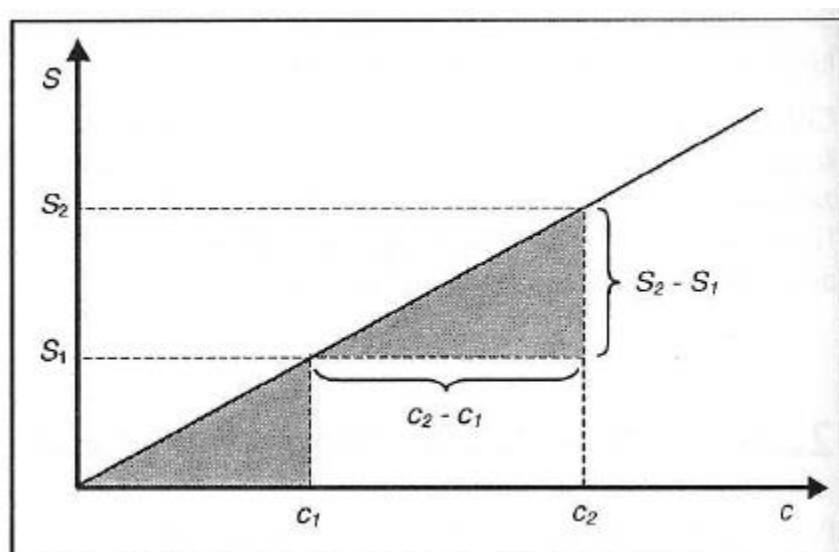
Metoda kalibrační křivky se provádí tím, že se připraví série standardních roztoků obsahující postupně rostoucí koncentraci stanovovaného vzorku, ze kterých sestavíme nejlépe lineární tvar závislosti. Poté se změří vzorek a z vytvořené kalibrační křivky odečteme obsah daného vzorku.

Metoda standardního přídatku (obrázek 3, 4) spočívá v přípravě analyzovaného vzorku a téhož vzorku, který obsahuje známé množství standardu. Po proměření obou vzorků se vypočítá obsah složky ve vzorku, který je přímo úměrný zvýšené hodnotě přidaného množství.^[5]

AAS se využívá k analýze vody, ovzduší, živočišných a rostlinných materiálů, potravin, klinických tekutin a tkání aj. Stanovovaná koncentrace se pohybuje od desetin $\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$ po desetiny $\text{g} \cdot \text{l}^{-1}$.^[4]



Obrázek 3 Příprava vzorků při metodě standardního přídavku – převzato z KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody.^[5]



Obrázek 4 Vyhodnocení metody standardního přídavku - převzato z KLOUDA, Pavel. Moderní analytické metody.^[5]

3.5. Validace analytických metod

Validace metod ve farmacii se řídí platnými předpisy a doporučeními, především ICH směrnice řady Q (Q2A a Q2B).^[21]

Pomocí validace analytické metody se zjišťují nejdůležitější charakteristiky metody a udává, zdali je vypracovaná metoda vhodná pro daný účel. Validace má za cíl stanovit podmínky, při kterých je zkušební postup použitelný, a zajistit spolehlivost při opakovaném použití i v různých laboratořích.^[22]

3.5.1. Správnost

Vyjadřuje shodu mezi správnou hodnotou a získaným výsledkem. Obvykle se stanovuje analýzou nejméně šesti vzorků a vyjádří se jako rozdíl správné a získané hodnoty nebo jako výtěžnost (recovery):^[22]

$$\text{Výtěžnost} = \frac{100 \cdot \text{nalezená hodnota}}{\text{správná hodnota}}$$

3.5.2. Přesnost

Udává míru shody mezi jednotlivými výsledky, které se získaly opakovaně s jedním homogenním vzorkem. Obvykle se vzorek analyzuje šestkrát a to kompletním postupem včetně přípravy vzorku (100 % koncentrace) nebo se provede nejméně 9 stanovení pokrývající příslušné koncentrační rozmezí (tj. minimálně 3 stanovení na minimálně 3 koncentračních úrovních).^[22] Když je metoda přesná, výsledky mají malé rozpětí, což je rozdíl mezi nejvyšší a nejnižší hodnotou ze série stanovení.^[5]

Přesnost se vyjádří jako relativní směrodatná odchylka těchto šesti popř. devíti stanovení. Rozlišují se tři úrovně přesnosti podle podmínek opakování:

Opakovatelnost – metoda se opakuje stejným způsobem, jedním pracovníkem, na tomtéž přístroji a se stejnými činidly.

Mezilehlá přesnost – metoda se provádí různými analytiky, přístroji, s různými činidly, v jiný den, avšak v jedné laboratoři a se stejným vzorkem.

Reprodukovatelnost – provádí se stejně jako mezilehlá přesnost, ale v různých laboratořích.^[22]

3.5.3. Linearita

Je schopnost udávat výsledky, které jsou přímo úměrné koncentraci stanovované látky. Stanovuje se obvykle minimálně pět různých koncentrací v rozmezí 50 – 150 % nebo 80 – 120 % deklarovaného obsahu; LOQ – 120 % limitu u příbuzných látek. Je-li metoda lineární, lze určit směrnici z jednoho kalibračního bodu. Pokud tomu tak není, je zapotřebí vyhodnocovat výsledky z celé kalibrační křivky.^[22]

3.5.4. Selektivita, specificita

Selektivita metody je vlastnost, kterou lze správně a specificky změřit danou látku v přítomnosti jiných látek, které lze očekávat. Mohou to být další účinné látky, které se vyskytují u složených přípravku, pomocné látky, rozkladné produkty, zbytková rozpouštědla a nečistoty, které vznikly v průběhu výroby. Tento parametr se doloží výsledky měření standardu a dále vzorků, jež neobsahují analyzovanou látku, ale obsahují další složky, rozkladné produkty, nečistoty.^[22]

3.5.5. Detekční limit (LOD)

LOD je nejnižší detekovatelná koncentrace látky, nestanovovaná kvantitativně a vyjadřuje citlivost metody. U instrumentálních metod se určí jako koncentrace analyzované látky s poměrem signálu k šumu s hodnotou 3. Zjištěný detekční limit se ověří analýzou příslušné koncentrace vzorku.^[22]

3.5.6. Kvantitativní limit (LOQ)

LOQ je nejnižší koncentrace látky, která je stanovitelná s přijatelnou přesností a správností. Jedná se též o parametr citlivosti metody. Často bývá vyjádřen jako koncentrace s poměrem signálu k šumu s hodnotou 10. Za limitující relativní směrodatnou odchylku se požaduje 10 %. Proto může být kvalitativní limit vyjádřen jako koncentrace, při jejíž analýze se dosáhne této relativní směrodatné odchylky (obvykle to bývá trojnásobek LOD).^[22]

3.5.7. Robustnost

Vyjadřuje, jaká je míra vlivu proměnných podmínek na výsledky analýzy. Cílem je upozornit na podmínky, které mohou výsledky ovlivnit.^[22]

3.6. Validace metody AAS

3.6.1. Přesnost - výtěžnost

Dle evropského lékopisu se přesnost ověřuje za použití referenčních materiálů (CRM). Když to není možné (v našem případě), místo toho se provede zkouška výtěžnosti. Výtěžnost pro stanovení obsahu by měla být v rozmezí 90 % až 110 %. Zkouška je neplatná, pokud je výtěžnost mimo rozmezí 80 % až 120 %.^[23]

3.6.2. Opakovatelnost

Opakovatelnost pro stanovení obsahu je nejvýše 3 %, pro zkoušku na nečistoty nejvýše 5 %.^[23]

3.6.3. Linearita

Je požadováno připravit nejméně čtyři porovnávací roztoky v kalibračním rozmezí, kontrolní roztok a provede se nejméně pět opakovaných měření. Aby byl pracovní postup správný, korelační koeficient (R^2) musí být nejméně 0,99.^[23]

3.6.4. Mez stanovitelnosti

V AAS mez stanovitelnosti stanovuje koncentraci nebo množství analytu ve vzorku, která vyvolává signál, který je roven desetinásobku směrodatné odchylky signálu tzv. slepého pokusu.^[23]

3.7. Shimadzu AA-7000 Series

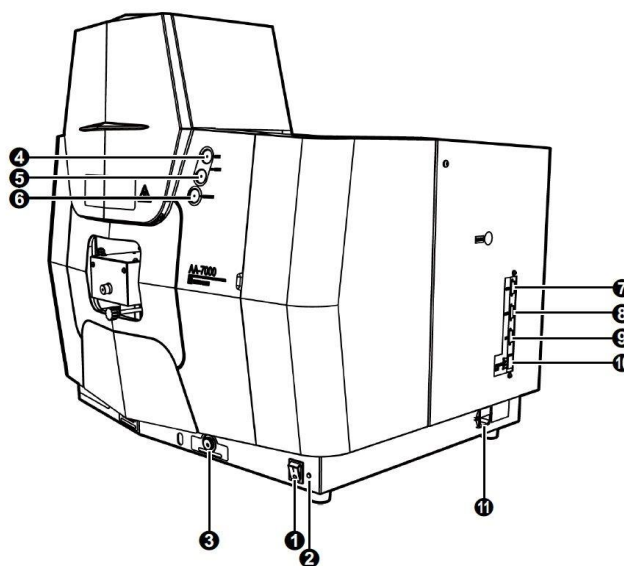
Měření diplomové práce probíhalo na přístroji Shimadzu AA-7000 Series. Jedná se o moderní atomový absorpční spektrometr. Přístroj pro plamenovou analýzu obsahuje 6 lamp, 2 lampy můžou pracovat v jeden čas, využívá dvou metod – D₂ metoda (metoda deuteriové lampy – touto metodou se měřilo) a SR metody.

Výhodou je malé množství vzorku potřebné k detekci. Pro zajištění kontinuálního přísunu vzorku do plamene je zapotřebí objem vzorku alespoň 1 ml.

Nosným plynem, který se používá, je vzduch – acetylen. Přístroj je vybaven bezpečnostními sensory. Pokud sensory zjistí abnormality, zavře se přívod plynu a plamen je okamžitě zhasnut. Mezi bezpečnostní prvek patří i to, že je nutné k zažehnutí plamene stisknout dvě tlačítka současně.

Shimadzu AA – 7000 Series využívá software WizAard Launcher, který slouží k nastavení parametrů měření a vyhodnocení výsledku měření.^[24]

Hlavní jednotka

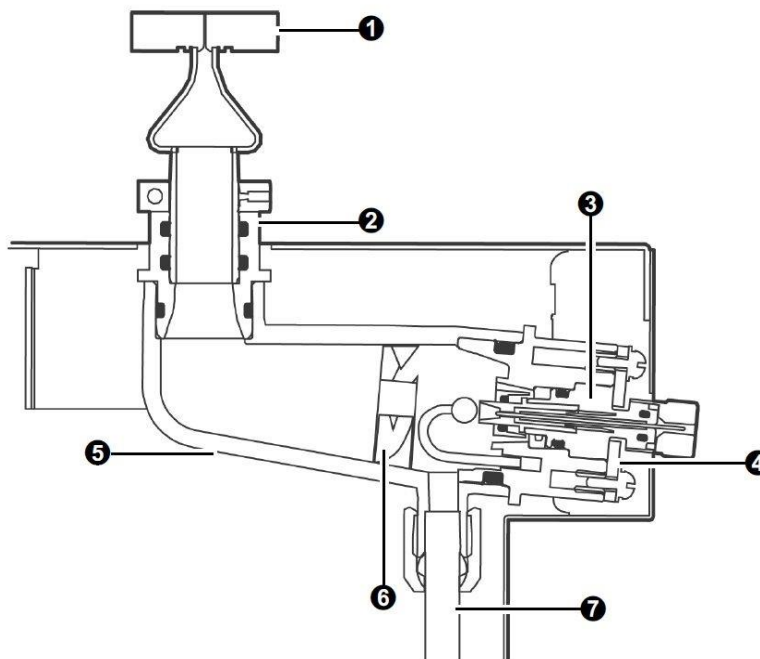


Obrázek 5 Hlavní jednotka AA-7000 Series – převzato z *Shimadzu Atomic Absorption spectrophotometer AA-7000 Series: Instruction manual*^[24]

- 1 - Vypínač
- 4 - Purge tlačítko – pomocí tohoto tlačítka je přiváděn plyn (vzduch nebo N₂O), pokud je s tímto tlačítkem společně přidrženo zapalovací tlačítko, dojde k zažehnutí plamene
- 5 - Zapalovací tlačítko
- 6 - Zhasínací tlačítko – stisknutím zhasne plamen
- 9 - Připojení kabelem k počítači^[24]

Hořák

Hlava hořáku, která má standardní délku štěrby 10 cm, je umístěna v atomizéru mísící komory. Pro tento typ hořáku je vhodné použití plynu vzduch – acetylen. Na následujícím obrázku je popsán hořák.^[24]

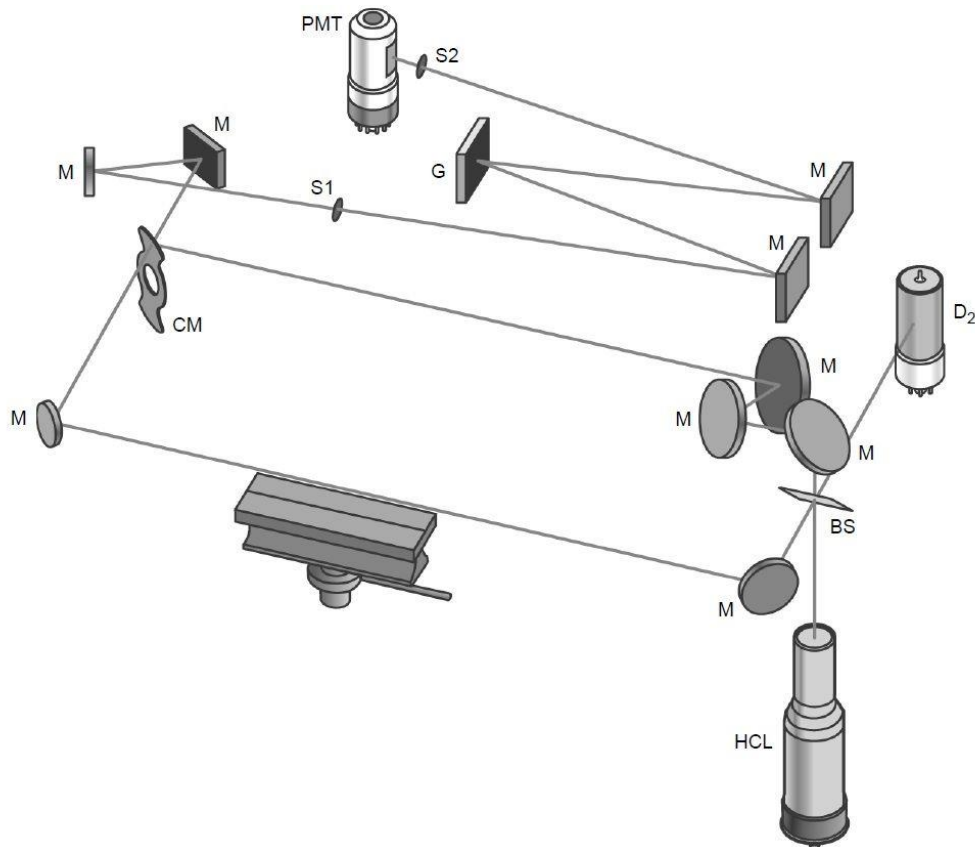


Obrázek 6 Hořák – převzato z *Shimadzu Atomic Absorption spectrophotometer AA-7000 Series: Instruction manual*^[24]

- 1 - Hlava hořáku
- 2 - Zásuvka hořáku
- 3 - Nebulizér
- 4 - Upevňovací šrouby a deska nebulizéru
- 5 - Komora
- 6 - Míchací zařízení
- 7 - U – trubice – odvádí velké částice^[24]

Optický systém

Tento přístroj využívá dvoupaprskového systému. Funkce je podrobněji popsána v kapitole 3.4.4. Na následujícím obrázku je znázorněn optický systém přístroje.^[24]



Obrázek 7 Dvoupaprskový optický systém – převzato z *Shimadzu Atomic Absorption spectrophotometer AA-7000 Series: Instruction manual*^[24]

- HCL - Dutá katoda
- D₂ - Deuteriová lampa
- PTM - Detektor
- M - Zrcadla^[24]

4. Experimentální část

4.1. Materiály a pomůcky

V této diplomové práci byly použity následující materiály a pomůcky.

4.1.1. Chemikálie

- Glukóza – bílý krystalický prášek, sladké chuti, snadno rozpustná ve vodě, mírně rozpustná v lihu 96 %. [25]

4.1.2. Další použité chemikálie

- isobutyl(methyl)keton R, Penta ČR
- standard olova (1000 mg/l), Fluka Švýcarsko
- amonium-pyrrolidinkarbodithioát R, Sigma Švýcarsko
- kyselina octová ledová R, Penta ČR
- standard niklu (1000 mg/l), Fluka Švýcarsko
- čištěná voda R

4.1.3. Přístroj

- Shimadzu AA – 7000 Series
 - plamen – acetylen – vzduch
 - PC program – WizAArd Launcher Application, verze 5.0.0.0

4.1.4. Podmínky měření

- vlnová délka – $\lambda_{\text{Pb}} = 283,3 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Ni}} = 232,0 \text{ nm}$
- zdroj záření – lampa pro olovo, resp. lampa pro nikl s dutou katodou
- plamen – vzduch – acetylen
- blank = kontrolní roztok – pomocí něho se nastaví nulová poloha přístroje

4.1.5. Další použité přístroje

- Digitální váhy Sartorius AG typ A200S, Německo

4.1.6. Pomůcky

- odměrné baňky, kádinky, odměrné válce, dělicí nálevky, zkumavky, stojan na zkumavky, pipety, tyčinky, vážící lodička, zátky, lžičky, alobal

4.2. Příprava roztoků

4.2.1. Linearita - olovo

Kalibrační křivka byla vytvořena pomocí 6 roztoků se zvyšující se koncentrací a jednoho kontrolního roztoku. Pracovalo se dle kapitoly 2.4.10. Lead in sugars^[23] metodou přímé kalibrace.

Roztoky byly připraveny dle Ph. Eur. 7.7 .

Příprava roztoků

Příprava základního roztoku olova (10 µg Pb/ml):

Roztok byl připraven ředěním 1,0 ml standardu olova o koncentraci 1000 mg/l 100,0 ml vody.

Příprava čirého roztoku amonium-pyrrolidinkarbodithioátu R (10 g/l):

Do 100 ml odměrné baňky bylo naváženo $n = 0,9995$ g amonium-pyrrolidinkarbodithiátu a doplněno vodou po rysku.

Příprava kyseliny octové zředěné RS:

Kyselina octová zředěná RS byla připravena smísením 12 g kyseliny octové ledové R (99 %) v 100,0 ml vody.

Příprava směsi stejných objemových dílů kyseliny octové zředěné RS a vody R:

Roztok byl připraven smícháním stejných objemových dílů kyseliny octové zředěné RS a vody R.

Příprava porovnávacích roztoků a kontrolního roztoku:

Kontrolní roztok (blank) – k 100,0 ml stejných objemových dílů kyseliny octové zředěné RS a vody R byly přidány 2,0 ml čirého roztoku amonium-pyrrolidinkarbodithioátu R a 10,0 ml isobutyl(methyl)ketonu R.

Porovnávací roztok č. 1 – do 100 ml odměrné baňky bylo pipetováno 0,25 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml) a doplněno po rysku směsí kyseliny octové zředěné RS a vody R. K tomuto roztoku byly přidány 2,0 ml čirého roztoku amonium-

pyrrolidinkarbodithioátu R a 10,0 ml isobutyl(methyl)ketonu R. Takto byly připraveny všechny porovnávací roztoky, lišily se pouze v objemu základního roztoku olova.

Porovnávací roztok č. 2 – přidáno 0,5 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

Porovnávací roztok č. 3 - přidáno 0,75 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

Porovnávací roztok č. 4 - přidáno 1,0 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

Porovnávací roztok č. 5 - přidáno 1,25 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

Porovnávací roztok č. 6 - přidáno 1,5 ml základního roztoku olova (10 µg Pb/ml).

Všechny roztoky byly postupně protřepávány po dobu 30 sekund za chránění před přímým světlem (dělicí nálevka byla zabalena do alobalu). Po oddělení obou vrstev byla dále použita horní vrstva isobutyl(methyl)ketonu.

Takto byla připravena řada roztoků pro kalibrační křivku o koncentraci viz tabulka 1.

Tabulka 1 Koncentrace porovnávacích roztoků

Porovnávací roztok č.	Objem základního roztoku olova (10 µg Pb/ml)	Koncentrace roztoku (µg/g)
1	0,25 ml	0,125 µg/g
2	0,5 ml	0,25 µg/g
3	0,75 ml	0,375 µg/g
4	1,0 ml	0,5 µg/g
5	1,25 ml	0,625 µg/g
6	1,5 ml	0,75 µg/g

4.2.2. Linearita – nikel

Kalibrační křivka byla připravena dle kapitoly 2.4.15. Nickel in polyols.^[23]

Roztoky byly připraveny stejným postupem, jak bylo uvedeno v kapitole 4.2.1., pouze místo základního roztoku olova byl použit základní roztok niklu o koncentraci 10 µg Ni/ml.

4.2.3. Příprava roztoků zkoušené látky – glukózy

Zkoušený vzorek glukózy pro stanovení olova byl připraven dle kapitoly 2.4.10. Lead in sugars, pro stanovení niklu dle kapitoly 2.4.15. Nickel in polyols.^[23] Příprava roztoku byla stejná podle obou kapitol. Použité roztoky byly popsány v kapitole 4.2.1.

Příprava zkoušeného roztoku glukózy:

20,0 g glukózy bylo rozpuštěno ve směsi stejných objemových dílů kyseliny octové zředěné RS a vody R a doplněno na 100,0 ml v odměrné baňce. Roztok byl přelit do dělicí nálevky, byly přidány 2,0 ml čirého roztoku amonium-pyrrolidinkarbodithioátu R (10 g/l) a 10,0 ml isobutyl(methyl)ketonu R. Po dobu 30 sekund byla směs protřepávána za chránění před přímým světlem. Po oddělení obou vrstev byla dále použita vrstva isobutyl(methyl)ketonu.

4.2.4. Přesnost - opakovatelnost – olovo, nikel

Bylo připraveno 6 vzorků zkoušeného roztoku glukózy. Příprava byla popsána v kapitole 4.2.3 a dále 3 porovnávací roztoky o koncentraci olova a niklu 0,25 µg/g; 0,5 µg/g; 0,75 µg/g. Příprava porovnávacích roztoků byla popsána v kapitole 4.2.1. pro olovo a 4.2.2. pro nikel.

Oddělená vrstva isobutyl(methyl)ketonu byla dále analyzována v přístroji.

4.2.5. Správnost – olovo, nikel

Roztoky pro správnost byly připraveny stejným způsobem jako pro přesnost. Koncentrace olova a niklu v porovnávacích roztocích byla 0,25 µg/g; 0,5 µg/g; 0,75 µg/g a 1,0 µg/g. Příprava porovnávacích roztoků u prvních třech koncentrací byla popsána v kapitole 4.2.1. pro olovo, pro nikel v kapitole 4.2.2. Porovnávací roztok o koncentraci 1,0 µg/g byl připraven přidáním 1,75 ml základního roztoku olova (niklu) o koncentraci 10 µg/ml.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Správnost - olovo

Bylo proměřováno 6 vzorků připravených podle kapitoly 4.2.5. a dále porovnávací roztoky o koncentraci uvedené v tabulce 2.

Tabulka 2 Správnost - naměřené hodnoty pro olovo

Správnost - Pb	absorbance vzorku č.						
c (ug Pb/ g Glu)	1	2	3	4	5	6	
0,25	0,0137	0,0143	0,0152	0,0138	0,0143	0,0129	
0,5	0,0268	0,0309	0,0278	0,0297	0,0275	0,0285	
0,75	0,0423	0,0457	0,0460	0,0455	0,0432	0,0431	
1,0	0,0574	0,0592	0,0598	0,0608	0,0582	0,0559	
rovnice přímky	$y = 0,0586x + 0,0131$	$y = 0,0598x + 0,0151$	$y = 0,0608x + 0,0144$	$y = 0,0627x + 0,0139$	$y = 0,059x + 0,0137$	$y = 0,0574x + 0,0136$	
R ²	0,9987	0,9978	0,9954	0,9999	0,9979	0,9981	
výtěžnost (%)	89,28%	98,55%	94,40%	88,07%	91,65%	93,93%	$\phi = 92,65\%$

Požadavek:

Výtěžnost 90 – 110 %

Vyhodnocení:

Výtěžnost pro olovo byla 92,65 %.

5.2. Opakovatelnost – olovo

Bylo proměřováno 6 vzorků připravených podle kapitoly 4.2.4. a dále porovnávací roztoky o koncentraci uvedené v tabulce 3.

Tabulka 3 Opakovatelnost - naměřené hodnoty pro olovo

Opakovatelnost - Pb	absorbance vzorku č.						
	1	2	3	4	5	6	
c (ug Pb/ g Glu)							
0	0,0004	0,0010	0,0007	0,0010	0,0007	0,0007	
0,25	0,0137	0,0143	0,0152	0,0138	0,0143	0,0129	
0,5	0,0268	0,0309	0,0278	0,0297	0,0275	0,0285	
0,75	0,0423	0,0457	0,0460	0,0455	0,0432	0,0431	
rovnice přímky	$y = 0,05552x + 0,00002$	$y = 0,06028x + 0,00037$	$y = 0,0594x + 0,00015$	$y = 0,05976x + 0,00009$	$y = 0,05628x + 0,00032$	$y = 0,05712x + 0,00012$	
R ²	0,9983	0,9984	0,9943	0,9975	0,9984	0,9976	
koncentrace Pb (ug/g)	0,2235	0,2525	0,2368	0,2217	0,2322	0,2369	RSD(%) = 4,77

Požadavek:

RSD nejvýše 5 %

Vyhodnocení:

Relativní směrodatná odchylka byla 4,77 %.

5.3. Správnost - nikl

Měření probíhalo stejně, jak bylo uvedeno v kapitole 5.1.

Tabulka 4 Správnost - naměřené hodnoty pro nikl

Správnost - Ni	absorbance vzorku č.						
c (ug Ni/ g Glu)	1	2	3	4	5	6	
0,25	0,0721	0,0771	0,0277	0,0508	0,0256	0,0226	
0,5	0,1325	0,1345	0,0505	0,1106	0,0512	0,0501	
0,75	0,1962	0,1991	0,0784	0,1611	0,0712	0,0692	
1,0	0,2772	0,2821	0,1021	0,2141	0,0984	0,0959	
rovnice přímky	$y = 0,2716x + 0,0677$	$y = 0,2718x + 0,0713$	$y = 0,1004x + 0,027$	$y = 0,2162x + 0,0531$	$y = 0,0954x + 0,0258$	$y = 0,0956x + 0,0236$	
R ²	0,9950	0,9927	0,9986	0,9987	0,9969	0,9955	
výtěžnost (%)	94,32%	96,66%	101,93%	97,60%	97,06%	92,03%	$\phi = 96,60\%$

Požadavek:

Výtěžnost 90 – 110 %

Vyhodnocení:

Výtěžnost pro nikl byla 96,90 %.

5.4. Opakovatelnost – nikel

Měření probíhalo stejně, jak bylo uvedeno v kapitole 5.2.

Tabulka 5 Opakovatelnost - naměřené hodnoty pro nikel

Opakovatelnost - Ni	absorbance vzorku č.						
	1	2	3	4	5	6	
c (ug Ni/ g Glu)							
0	0,0009	0,0013	0,0014	0,0007	0,0021	0,0019	
0,25	0,0721	0,0771	0,0277	0,0508	0,0256	0,0226	
0,5	0,1325	0,1345	0,0505	0,1106	0,0512	0,0501	
0,75	0,1962	0,1991	0,0784	0,1611	0,0712	0,0692	
rovnice přímky	$y = 0,25852x + 0,00348$	$y = 0,26032x + 0,00538$	$y = 0,10152x + 0,00143$	$y = 0,2164x + 0,00035$	$y = 0,09316x + 0,00259$	$y = 0,09176x + 0,00154$	
R ²	0,9989	0,9970	0,9987	0,9988	0,9978	0,9954	
koncentrace Ni (ug/g)	0,2493	0,2623	0,2689	0,2456	0,2704	0,2469	RSD(%) = 4,40

Požadavek:

RSD nejvýše 5 %

Vyhodnocení:

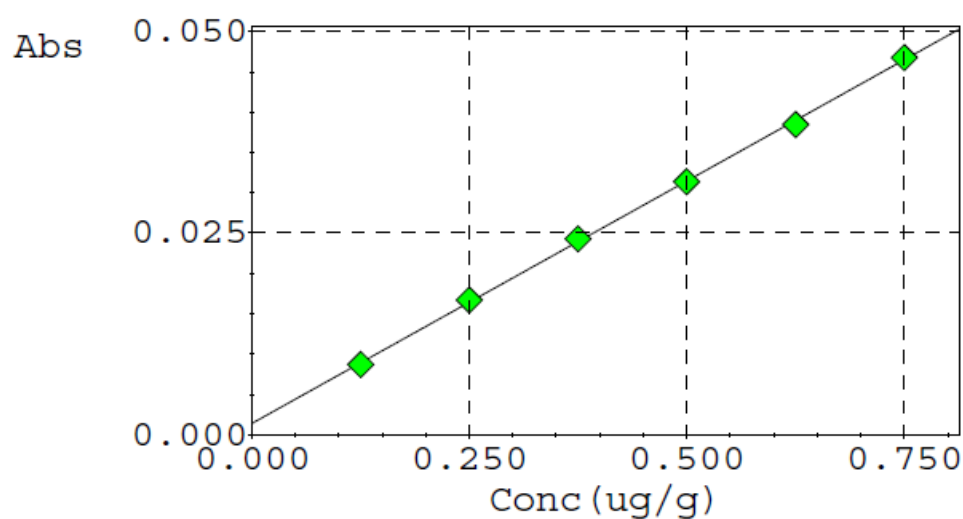
Relativní směrodatná odchylka byla pro stanovení obsahu 4,40 %.

5.5. Linearita - olovo

Při vlnové délce $\lambda = 283,3$ nm byla proměřena kalibrační křivka (obrázek 9) z připravených roztoků uvedených v kapitole 4.2.1. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 6.

Obrázek 8 Kalibrační křivka - olovo

Calibration Curve (C# : 01)



Tabulka 6 Linearita - naměřené hodnoty pro olovo

Linearita - Pb	
c (ug/g)	absorbance
0	0,0005
0,125	0,0087
0,25	0,0167
0,375	0,0243
0,5	0,0314
0,625	0,0385
0,75	0,0468
rovnice přímky	$y = 0,060114x + 0,0014333$
R ²	0,9997

Požadavek:

Korelační koeficient $R^2 \geq 0,99$

Vyhodnocení:

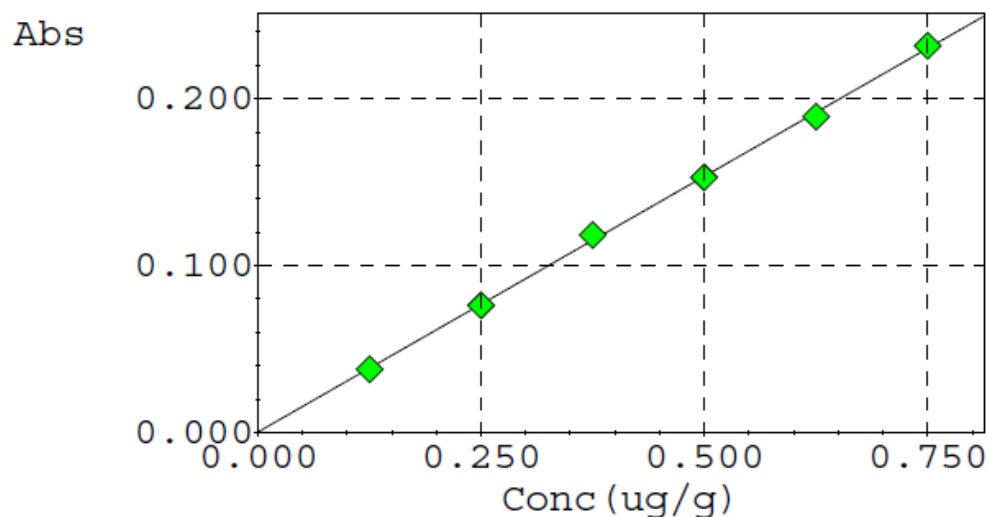
Korelační koeficient byl 0,9997.

5.6. Linearita - nikl

Při vlnové délce $\lambda = 232,0$ nm byla proměřena kalibrační křivka (obrázek 10) z připravených roztoků uvedených v kapitole 4.2.2. Naměřené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 7.

Obrázek 9 Kalibrační křivka - nikl

Calibration Curve (C# : 01)



Tabulka 7 Linearita - naměřené hodnoty pro nikl

Linearita - Ni	
c (ug/g)	absorbance
0	0,0012
0,125	0,0380
0,25	0,0763
0,375	0,1185
0,5	0,1529
0,625	0,1892
0,75	0,2317
rovnice přímky	$y = 0,30665x + 0,00027333$
R ²	0,9996

Požadavek:

Korelační koeficient $R^2 \geq 0,99$

Vyhodnocení:

Korelační koeficient byl 0,9996.

6. Závěr

1. Byly zpracovány literární zdroje týkající se atomové absorpční spektrometrie, validace analytických metod, olova a niklu.
2. Byla validována metoda sloučení lékopisných metod stanovení olova v cukrech a niklu v polyolech atomovou absorpční spektrometrií.
3. Byla ověřena přesnost metody. Relativní směrodatná odchylka pro stanovení olova činila 4,77 %, pro stanovení niklu 4,40 %. V obou případech byla relativní směrodatná odchylka nižší než 5,0 %.
4. Byla testována správnost metody. Výtěžnost olova byla 92,65 %, výtěžnost niklu 96,90 %. Pro oba prvky byla výtěžnost metody v rozmezí 90 – 110 %.
5. Dále byla ověřena linearita. Pro stanovení olova byl korelační koeficient roven 0,9997, pro stanovení niklu 0,9996. Koeficient korelace byl u obou prvků vyšší než 0,99.
6. Metoda vyhovuje testovaným validačním parametrům.

7. Použitá literatura

- [1] LÜLLMANN, H., MOHR, K., WEHLING, M., *Farmakologie a toxikologie: překlad 15., zcela přepracovaného vydání*. Vyd. 2. české. Praha: Grada, 2004, s. 609–610, ISBN 80-247-0836-1.
- [2] MAREK J., *Farmakoterapie vnitřních nemocí*. 4., zcela přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2010, s. 710–711, ISBN 978-802-4726-397.
- [3] BARCELOUX, D.G. Nickel. *Clinical Toxicology* [online]. 1999, roč. 37, č. 2, s. 239 - 258 [cit. 2013-02-26]. ISSN 1556-3650. DOI: 10.1081/CLT-100102423. Dostupné z: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1081/CLT-100102423>
- [4] KOMÁREK, J., *Atomová absorpční spektrometrie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2000, s. 5–7, 14–16, 83, ISBN 80-210-2500-X.
- [5] KLOUDA, P., *Moderní analytické metody*. 2. uprav. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, s. 7–8, 58, 64–69, 90, ISBN 80-863-6907-2.
- [6] KOMÍNKOVÁ, J., MESTEK O. *Atomová absorpční spektrometrie. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze: Ústav analytické chemie VŠCHT Praha, Laboratoř z analytické chemie II* [online]. 1997 [cit. 2013-02-28]. Dostupné z: <http://www.vscht.cz/anl/lach2/AAS.pdf>
- [7] MAREČEK, A., HONZA, J., *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. 3., přeprac. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005, s. 63, ISBN 80-7182-055-5.
- [8] KRŠKOVÁ-BATÁRIOVÁ, A., ČERNÁ M., PUKLOVÁ, V. *Obsah olova v krvi dětí a dospělých. Státní zdravotní ústav: Témata zdraví a bezpečnosti - Zdraví a životní prostředí - Indikátory zdraví a životního prostředí - Chemické látky a fyzikální faktory* [online]. 2009 [cit. 2013-02-25]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/zivotni-prostredi/obsah-olova-v-krvi-deti-a-dospelych>

- [9] HÁJKOVÁ, J. Těžké kovy v životním prostředí a jejich vliv na lidský organismus. *Celostnimedica.cz: Informační server o zdraví* [online]. 2006 [cit. 2013-03-05]. Dostupné z: <http://www.celostnimedica.cz/tezke-kovy-v-zivotnim-prostredi-a-jejich-vliv-na-lidsky-organismus.htm>
- [10] Endocrine disruptors. *National Institute of Environmental Health Sciences: Health and Education* [online]. 2012 [cit. 2013-02-25]. Dostupné z: <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/endocrine/index.cfm>
- [11] POCKOCK S.J., SMITH M., BAGHURST, P. Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ: British medical journal / British Medical Association* [online]. 1994, roč. 309, č. 6963, s. 1189–1197 [cit. 2013-02-25]. ISSN 0959-8138. DOI: 10.1136/bmj.309.6963.1189. Dostupné z: <http://www.bmj.com/cgi/doi/10.1136/bmj.309.6963.1189>
- [12] FADROWSKI J.J., NAVAS-ACIEN A., TELLEZ-PLAZA M. Blood lead level and kidney function in US adolescents: The Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Archives of Internal Medicine* [online]. 2010, vol. 170, issue 1, s. 75–82 [cit. 2013-03-06]. DOI: 10.1001/archinternmed.2009.417. Dostupné z: <http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=481524>
- [13] MAREČEK, A., HONZA J., *Chemie pro čtyřletá gymnázia*. 3., přeprac. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2005, s. 165, ISBN 80-7182-141-1.
- [14] LIDEN, C. Nickel in jewellery and associated products. *Contact Dermatitis* [online]. 1992, roč. 26, č. 2, s. 73–75 [cit. 2013-02-26]. ISSN 0105-1873. DOI: 10.1111/j.1600-0536.1992.tb00887.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-0536.1992.tb00887.x>
- [15] KOŽÍŠEK, F., NĚMCOVÁ, V., GARI D.W. Kovy a související látky v pitné vodě: Hodnocení zdravotních rizik niklu v pitné vodě. *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě* [online]. 2010 [cit. 2013-02-26]. Dostupné z: http://meteau.cz/zpravy/2009/zprava_nikl_rizika_final2010.pdf

- [16] XIE J., FUNAKOSHI T., SHIMADA H. Effects of chelating agents on testicular toxicity in mice caused by acute exposure to nickel. *Toxicol* [online]. 1995, č. 103 [cit. 2013-03-04]. Dostupné z:
http://pubget.com/paper/8553358/Effects_of_chelating_agents_on_testicular_toxicity_in_mice_caused_by_acute_exposure_to_nickel
- [17] TANDON, S.K., SINGH S., JAIN V.K. Chelation in metal intoxication XXXVIII: Effect of structurally different chelating agents in treatment of nickel intoxication in rat. *Fund Appl Toxicol* [online] 1996, č. 31 [cit. 2013-03-04]. Dostupné z:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272059096900858>
- [18] HOSTÝNEK, J. Nickel-induced hypersensitivity: etiology, immune reactions, prevention and therapy. *Archives of dermatological research* [online] 2002, vol. 294, č. 6, p. 249-267. ISSN 0340-3696 [cit. 2013-04-28]. Dostupné z:
<http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00403-002-0319-x>
- [19] NĚMCOVÁ, I., *Spektrometrické analytické metody I*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1997, s. 5, 8–13, 38, 89, 125, 155–156, 159, 163, ISBN 80-718-4365-2.
- [20] GARCES, F. Atomic Absorption Spectroscopy: Instrumental. In: *Sand Diego Miramar College: Dr. Fred Omega Garces HomePage* [online]. [cit. 2013-02-28]. Dostupné z:
http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/AA/AAS_Instrument/AASInstruments.htm
- [21] DOHNAL J., BRUSOVÁ H., *Moderní přístupy k farmaceutické analýze*, Farmaceutická fakulta Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Praha 2010, s. 27–42, 64–83, ISBN 978-80-7305-085-6.
- [22] KLIMEŠ, J. a kolektiv, *Kontrola léčiv II*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, s. 79–81. Učební texty (Univerzita Karlova). ISBN 80-246-0818-9.

- [23] *European pharmacopoeia*. 7th ed. Strasbourg: Council Of Europe, 2010, s. 38, 117–118, ISBN 978-928-7167-002.
- [24] *Shimadzu Atomic Absorption spectrophotometer AA-7000 Series: Instruction manual*. Shimadzu Corporation, 2009, 398 s.
- [25] *Český lékopis 2009*. 1. vyd. Praha: Grada Publishing, 2009, s. 2195, ISBN 978-802-4729-947.